



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

THÂMARA MANOELA MARINHO BEZERRA

**IMUNOEXPRESSÃO DA IL-17 E ROR γ t
EM CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE LÁBIO E LÍNGUA**

Natal/RN

2014

THÂMARA MANOELA MARINHO BEZERRA

**IMUNOEXPRESSÃO A IL-17 E ROR- γ t EM CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE LÁBIO E LÍNGUA**

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina da Costa Miguel

Natal/RN

2014

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia
Biblioteca Setorial de Odontologia "Prof^o Alberto Moreira Campos".

Bezerra, Thâmara Manoela Marinho Bezerra.

Imunoexpressão da IL-17 e ROR γ t em carcinomas de células escamosas de lábio e língua / Thâmara Manoela Marinho Bezerra. – Natal, RN, 2014.
103 f. : il.


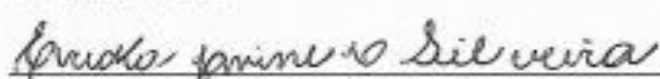
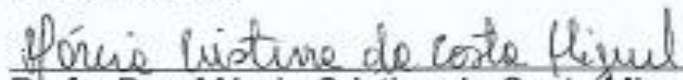
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina da Costa Miguel.

Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

CONCEITOS EMITIDOS PELOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA THÂMARA MANOELA MARINHO
BEZERRA

	CONCEITO
 _____ Profa. Dra. Roberta Barroso Cavalcante Universidade de Fortaleza 1º Examinador	<u> A </u>
 _____ Profa. Dra. Ericka Janine Dantas da Silveira Universidade Federal do Rio Grande do Norte 2º Examinador	<u> A </u>
 _____ Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel Universidade Federal do Rio Grande do Norte 3º Examinador	<u> A </u>

Natal, 27 de fevereiro de 2014

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcuta.

DEDICATÓRIA

*Ao meu amado avô Fernando Marinho (em memória) na certeza de que,
um dia, iremos nos reencontrar.*

...dedico

*“Viver é sempre dizer aos outros que eles são importantes, que nós os
amamos, porque um dia eles se vão e ficamos com a nítida impressão de
que não o amamos o suficiente.”*

Chico Xavier.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Márcia Miguel, minha orientadora e “mãe patológica”. Por todo amor e dedicação que me conduziu para a realização dessa pesquisa. Uma pessoa de grande inteligência e que tem muito o que ensinar e compartilhar. Deixar o doutorado em Patologia Oral será mais doloroso, pois será sinônimo de deixá-la também. O que levarei dela será muito mais do que artigos publicados e conhecimentos repassados, mas sim um carinho, que aflorou apesar do curto período de tempo. Obrigada por nunca ter desistido de mim e de ter sido capaz de ver, em minha pessoa, um diamante, porém ainda muito bruto. Obrigada por entender minhas profundas limitações e por me ajudar a transpô-las com tanta leveza e sabedoria. Obrigada pelos sorrisos compartilhados nos momentos de descontração e alegria. Obrigada por me ajudar a achar o meu lugar no mundo. Levarei seus ensinamentos por toda a minha prática docente.

À Profa. Dra. Éricka Silveira, minha segunda “mãe patológica”. Ela me adotou como “filha” e também agarrou esse projeto como se fosse dela. Uma pessoa que cativa pelo seu jeito de ser, de ensinar e que nos motiva a buscar sempre mais conhecimento devido a todo seu encanto pela patologia. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos durante todo o mestrado, pelas sugestões no exame de qualificação desse trabalho e por tudo que me ensinou na Clínica de Estomatologia.

À vocês meu profundo respeito e admiração.

Agradeço a Deus e à Virgem Maria que sempre caminharam ao meu lado, iluminando-me, confortando-me, acalmando meu coração e, muitas vezes, até mesmo, segurando-me nos braços durante tantos momentos. Obrigada, Senhor por me permitir chegar até aqui.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN, Profa. Dra. Lélia Batista de Souza por ser um exemplo de profissional, pelo modo e dedicação que coordena esse programa, por ser fonte de inspiração para todos nós e pelos momentos de descontração compartilhados.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN, Profa. Dra. Ana Miryam Costa de Medeiros (pela sua doçura e agradável convívio na Clínica de Estomatologia), Prof. Dr. Antônio de Lisboa Costa (pelos conhecimentos transmitidos), Profa. Dra. Hébel Cavalcanti Galvão (pelos ensinamentos e simpatia), Prof. Dr. Leão Pereira Pinto (pelo incentivo e por me permitir desfrutar de seus profundos conhecimentos), Profa. Dra. Lélia Maria Guedes de Queiroz (pela simpatia, doçura e simplicidade. Obrigada pelas pertinentes colocações durante o exame de qualificação desse trabalho) e Profa. Dra. Roseana de Almeidas Freitas (pela gentileza e conhecimentos transmitidos).

Ao Prof. Dr. Manuel Antônio Gordón-Nuñez (por ser tão solícito, pelos ensinamentos e simplicidade) e Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka (pela disponibilidade, ensinamentos e pelos trabalhos desenvolvidos em parceria).

Às minhas primeiras professoras de Patologia Oral, Profa. Dra. Eveline Turatti e Profa. Dra. Roberta Barroso, pelas quais tenho profundo respeito e admiração. As aulas e a forma de lecionar delas me fizeram enxergar a Patologia com outros olhos e querer tomá-la também minha especialidade. Foi graças a vocês que minha vida tomou um rumo diferente (e pra melhor). Muito obrigada pelo carinho, por incentivarem tanto que eu seguisse a carreira acadêmica e por acreditarem que esse sonho seria possível. Essa conquista também é de vocês!

À minha professora de iniciação científica, Profa. Dra. Maria Vieira de Lima Saintrain, por me apresentar um novo horizonte: o da pesquisa científica.

Ao meu marido Hegel Jorge. Sou muito grata a Deus por ter achado, tão cedo, o que muita gente passa a vida inteira procurando: o grande amor da sua vida. Foi graças a ele que pude realizar o meu sonho em fazer o mestrado em Patologia Oral. Ele abraçou esse sonho como se fosse dele e embarcou nessa "aventura" comigo em outra cidade. A ele, meu porto seguro, meu cais... Com quem eu tenho todos os meus momentos de verdadeira sinceridade, com quem eu posso ser eu mesma, meu amor e melhor amigo. Sua ausência, nesses últimos anos, me fez ver que a felicidade só tem sentido quando é compartilhada.

Aos meus pais amados (Manoel e Nadja), pelo seu amor incondicional, por nunca pouparem esforços para a minha educação, por me darem todo o suporte e apoio necessários.

Aos meus irmãos (Patrícia e Rocky) por me ensinarem que o amor é capaz de resistir a tudo.

Às minhas amadas avós (Simone e Alzira) pelas orações incansáveis, pelo amor incondicional e por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Ao meu avô (Manoel – em memória) outro anjo que tenho no céu olhando por mim.

À Débora Arruda, minha amiga de infância e alma gêmea. Seu apoio nos primeiros dias em Natal foi crucial para que eu pudesse enfrentar o novo sem medo e com mais coragem.

À minha família UFRN: Andréia do Carmo (Andreiázinha), Bárbara Monteiro (Barbarinha), Luciana Castro (Lu), Luiz Juliasse, Marcelo Nascimento (Marcelinho), Maria Luiza (Malu), Thaís Maciel (Thaizinha), Tiago João (Tiaguito) e Viviane Alves (Vivi). Meus amigos de alma, um dos maiores presentes que a UFRN me deu. Vocês fazem parte de 760 páginas da história da minha vida... Do capítulo chamado amizade. Vocês me acolheram com tanto amor e realmente me adotaram. Obrigado por vocês terem sido minha família, quando eu precisava de uma... Meus irmãos,

quando eu precisava dividir, partilhar... Por serem meus pais, quando eu precisava de cuidados. A felicidade de vocês é a minha. Os levarei no meu coração onde quer que eu vá.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só, pois deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin.

À Andréiazinha, por sempre ter me ajudado em todas os momentos em que eu precisei. Pelas palavras de conforto, pelas alegrias, tristezas e confissões compartilhadas. Obrigada pelos cafés, pelo prazer da sua companhia, pelos conversas filosóficas, pelos abraços reconfortantes... Obrigada pela sua amizade.

À Barbarinha, minha “irmãzinha patológica”. Não teria aprendido tanta coisa no mestrado se não fosse por ela. Praticamente só faltava desenhar (na verdade, acho que desenhou) quando eu não entendia algo. Obrigada pela paciência, pelas risadas juntas, pelos abraços apertados... Obrigada por sempre dividir seus conhecimentos comigo, sempre fazendo questão que eu aprendesse. Obrigada por cuidar de mim como uma irmã mais velha e por me fazer acreditar no meu potencial. Mil vezes obrigada por tudo.

À Lu, pela sua calma e tranquilidade, por nossas conversas juntas, risadas e tantos sonhos em comum.

Ao Luiz, pelo carinho e respeito. Obrigada pelos ensinamentos na Clínica de Estomatologia.

Ao Marcelinho, o menino de maior coração que já encontrei. Obrigada por confiar em mim e por me dar o privilégio de ter sua amizade. Obrigada por trazer o Ceará pra mais perto do RN, fazendo-me sentir em casa.

À Maluzinha, o meu obrigado principalmente por ser tão doce e por seu otimismo. Isso me fazia muito bem. Obrigada pela sua paciência, pelos seus sorrisos, por sempre me ensinar, quando eu precisava, e por estar presente nos momentos de alegria e tristeza.

À Thaizinha, minha confidente, conselheira e responsável pelas madrugadas de estudo mais divertidas. Sua amizade é um tesouro pra mim. Obrigada por tornar meus dias em Natal mais fáceis e divertidos. Obrigada por cuidar de mim e pela sua sincera amizade.

Ao Tiaguito, o meu obrigado por ser tão leve. Esse seu jeito deixou as coisas aparentemente menos pesadas. Obrigada por ver em mim um potencial que eu não sabia ter. Obrigada pelos “papos-cabeça” e por me ajudar tanto a concretizar minhas idéias.

À Vivi, meu obrigado pelos seus conselhos, pelos momentos de descontração fora da patologia, pela sua disponibilidade em me ajudar sempre que eu precisava e por se preocupar tanto comigo.

Obriganda aos doutorandos, Ana Luiza (Aninha) e Denise (por deixarem a patologia mais “cor de rosa”, por encher aquele ambiente de alegria, pelo apoio nas horas difíceis e por estarem sempre prontas a tirar minhas dúvidas, pacientemente e pelos sorrisos “de graça”), Clarissa (pelas conversas, conhecimentos compartilhados e momentos de descontração), Keila (pela simplicidade e conselhos pertinentes), Melka Sá (pelos momentos de alegria e descontração, pelos artigos compartilhados, por ser tão sólicita e ter a capacidade de me fazer relaxar nos momentos mais tensos), Nathália (pela calma e simplicidade), Sthephânia (Sté) (pelos momentos de descontração, por compartilhar seus conhecimentos comigo, pela simplicidade e simpatia gratuita) e Roseane (Rose) (pelas “cortadas” mais desconcertantes, porém mais engraçadas!).

Ao já Doutor Joabe Pereira, meu “irmão patológico”. Por ter sido sempre tão sólicito nos momentos que eu precisei, por ter realizado a estatística desse trabalho de forma tão paciente, procurando sempre me acalmar quando o resultado não era o que eu esperava. Obrigada pela amizade que construímos, apesar do curto período de tempo.

A já Droutora Emeline, pela humildade e carinho.

Aos demais funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Gracinha, Lurdinha, Sandrinha, Ricardo, Hêvio e Idelzuíte pela gentileza e disponibilidade em ajudar. Obrigada por facilitar tantas vezes as coisas para nós, alunos do programa.

À CAPES pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desse curso.

RESUMO

As células Th17 têm sido fortemente associadas à patogênia de doenças autoimunes e inflamatórias, porém sua influência na carcinogênese ainda é pouco conhecida, havendo relatos de suas ações tanto antitumorais quanto pró-tumorais. O objetivo do presente trabalho foi pesquisar a presença da linhagem Th17 intratumoral em CCE de lábio e língua, através da análise da imunexpressão da IL-17 e do ROR γ t, relacionando estes achados com dados clínicos e morfológicos na tentativa de melhor compreender o papel dessas células na imunidade tumoral dos CCEOs. Na análise histomorfológica, observou-se predomínio de lesões de baixo grau em lábio e de alto grau em língua ($p = 0,024$). Não foi observada significância estatística entre estadiamento clínico e gradação histológica de malignidade ($p = 0,644$). Para o estudo imunohistoquímico, 5 campos aleatórios com maior imunorreatividade do infiltrado inflamatório peritumoral foram fotomicrografados no aumento de 400x. Realizou-se a contagem de linfócitos que exibiram marcação citoplasmática e pericitoplasmática para a citocina IL-17 bem como nuclear e citoplasmática para o ROR γ t. Foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de linfócitos imunopositivos para IL-17 entre os grupos de CCE de lábio e língua ($p = 0,028$). Para o ROR γ t não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de CCE de lábio e língua ($p = 0,915$). Não foi observada diferença estatística entre a imunomarcação da IL-17 e ROR γ t com gradação histológica de malignidade e com estadiamento clínico. Os achados dessa pesquisa sugerem um possível papel antitumoral da IL-17 para os casos de lábio. Os resultados da análise do ROR γ t, possivelmente se devem à ampla dualidade do papel pró-tumoral e antitumoral das células Th17 e à sua plasticidade que, na presença de diferentes citocinas expressas no microambiente tumoral, podem alterar seu fenótipo.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica; Células Th17; Interleucina-17; Receptores Nucleares Órfãos.

ABSTRACT

Th17 cells have been strongly associated to the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases, although their influence on the carcinogenesis is still little known, there are reports of anti-tumor and protumoral actions. The objective of this study is to research the presence of Th17 lineage in lip and tongue SCC, using the analysis of the immunoexpression of IL-17 and ROR γ t, relating this immunoexpression with clinical and morphological findings in the attempt to better comprehend the role of these cells on the tumoral immunity of OSCCs. The results were submitted to non-parametric statistical tests with significance level of 5%. On the histomorphological analysis, it was observed the predominance of low level lesions on lip and high level lesions on tongue ($p=0,024$). It was not observed statistical significance between clinical stage and histological gradation of malignancy ($p=0,644$). For the immunohistochemical study, 5 random fields with greater immunoreactivity of the peritumoral inflammatory infiltrate were photomicrographed on the 400x magnification. It was done the count of lymphocytes which showed cytoplasmic and pericytoplasmic staining for the IL-17 cytokine as well as nuclear and cytoplasmic staining for ROR γ t. It was observed statistical significance difference on the quantity of immunopositive lymphocytes to IL-17 between the groups of SCC of lip and tongue ($p=0,028$). For the ROR γ t it was not observed statistical significance difference between the groups of SCC of lip and tongue ($p=0,915$). It was not observed statistical difference between the immunostaining of IL-17 and ROR γ t with histological gradation of malignancy and clinical staging. The findings of this research suggest a possible anti-tumor role of IL-17 for cases of lip. The results of the analysis of the ROR γ t are possibly due to the wide duality of the anti-tumor and protumoral role of the Th17 cells and their plasticity which, in the presence of different cytokines expressed on the tumor microenvironment, can alter its phenotype.

Key-words: Immunohistochemistry, Th17 cells, Interleukin-17; Orphan Nuclear Receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Sistema de gradação de malignidade “Modo de invasão” recomendado por Bryne (1998).....	50
Quadro 2.	Especificidade, nº catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo.....	53
Gráfico 1.	Distribuição da amostra quanto ao tipo de lesão. Natal-RN, 2014.....	56
Figura 1A e 1B.	Fotomicrografia demonstrando o padrão de imunexpressão da IL-17 em região pericitoplasmática (setas pretas) e citoplasmática (setas brancas) em lábio (A) e em língua (B) - Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH® Kft. 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary, H-1121)	62
Figura 2A e 2B.	Fotomicrografia demonstrando o padrão de imunexpressão do ROR γ t em região citoplasmática (setas brancas) e nuclear/citoplasmática (setas pretas) em lábio (A) e em língua (B) - Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH® Kft. 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary, H-1121).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade, segundo Bryne (1998) e localização do CCE. Natal – RN, 2014	57
Tabela 2.	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade, segundo Bryne (1998) e o estadiamento clínico (TNM) para os casos de CCE de língua. Natal – RN, 2014.....	57
Tabela 3.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação à localização do CCE. Natal-RN, 2014	58
Tabela 4.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação à gradação histológica de malignidade segundo Bryne (1998). Natal-RN, 2014	59
Tabela 5.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação ao estadiamento clínico nos casos de CCEs em língua. Natal-RN, 2014	59
Tabela 6.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação a localização do CCE. Natal-RN, 2014	60
Tabela 7.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação à gradação histológica de malignidade segundo Bryne (1998). Natal-RN, 2014	60
Tabela 8.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação ao estadiamento clínico nos casos de CCEs em língua. Natal-RN, 2014	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC:** Do inglês, *Antigen- Presenting Cell*. Célula apresentadora de antígeno.
- B7-H1:** Do inglês, *B7 Homolog 1*. B7 homólogo 1.
- BCL-XL:** Membro da família da proteína BCL-2.
- CC:** Quimiocina da família CC.
- CCR:** Receptor de quimiocina da família CC.
- CD:** Do inglês, *Cluster of Differentiation*. Unidade de diferenciação: protocolo usado na identificação e investigação de moléculas de superfície celular, presentes nos leucócitos.
- CD25:** Cadeia alfa do receptor de IL-2.
- CD28:** Proteína co-estimuladora.
- CD36:** Proteína co-estimuladora.
- CD40:** Proteína co-estimuladora.
- CNS:** Conselho Nacional de Saúde.
- CCE:** Carcinoma de Células Escamosas.
- CCEO:** Carcinoma de Células Escamosas Oral.
- CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
- CTL:** Célula T citotóxicas CD8+.
- CTLA-4:** Do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*. Antígeno 4 Linfócito T citotóxico.
- CXC:** Quimiocina da família CXC.
- CXCR2:** Receptor de IL-8 β .
- DNA:** Do inglês, *deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico.
- E6 e E7:** Proteínas expressas nos estágios iniciais do ciclo de vida do HPV.
- ELISA:** Do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Ensaio imunoenzimático.
- FLIP:** Proteína anti-apoptótica.
- Foxp3:** Do inglês, *Forkhead Box P3*. Fator de transcrição das células Treg.
- GATA-3:** Fator de transcrição da linhagem Th2.
- GM-CFS:** Do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*. Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos.
- HE:** Hematoxilina-Eosina.
- HLA:** Do inglês, *Human Leukocyte Antigen G*. Antígeno leucocitário humano.
- HPV:** do inglês, *Human Papilloma Virus*. Vírus do Papiloma Humano.

IL: Interleucina: grupo de citocinas produzidas por uma grande variedade de células humanas.

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

INF- γ : Interferon gama. Citocina multifuncional.

MCP-1: Do inglês, *monocyte chemotactic protein-1*. Proteína 1 quimiotática para monócitos. Também conhecida como CCL2: quimiocina da família CC.

MHC: Do inglês, *Major Histocompatibility Complex*. Complexo principal de histocompatibilidade.

NK: do inglês, *Natural killer cells*. Célula assassina natural.

NOD: Do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*. Proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

p53: Proteína citoplasmática com função de manutenção da integridade do código genético.

PGE2: Prostaglandina E2.

pRb: Proteína envolvida na regulação do ciclo celular.

RANTES: Do inglês, *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*. Regulador da ativação de célula T normalmente expressa e secretada.

ROR γ t: Do inglês, *Factor Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma t*. Fator de transcrição das células Th17.

SCC: Do inglês, *Squamous Carcinoma Cell*. Carcinoma de Células Escamosas.

STAT: Do inglês, *Signal Transducers and Activators of Transcription* protein. Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição.

T-bet: Membro da família de fatores de transcrição T-box que regula a diferenciação da linhagem Th1.

TCR: Do inglês, *T Cell Receptor*. Receptor de célula T.

TGF- β : Do inglês, *Transforming Growth Factor beta*. Fator transformador do crescimento beta.

Th: Do inglês, *T Helper*. Células T auxiliares.

TLR: Do inglês, *Toll-like receptors*. Receptore semelhante a Toll.

TNF- α : Do inglês, *Tumor Necrosis Factor alfa*. Citocina multifuncional.

TNM: Principal sistema usado no estadiamento do câncer. Verifica o tamanho do tumor (T), presença de comprometimento linfonodal (L) e presença de metástase (M).

Treg: Do inglês, *Regulatory T cells*. Célula T regulatória.

UFRN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

VEGF: Do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*. Fator de crescimento vascular endotelial.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	28
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
	2.1. CÂNCER DE BOCA	31
	2.2. RESPOSTA TH17.....	35
3.	PROPOSIÇÃO.....	47
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
	4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	49
	4.2. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	49
	4.2.1. VARIÁVEIS.....	49
	4.3. POPULAÇÃO	49
	4.4. AMOSTRA.....	49
	4.4.1. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	50
	4.5. ANÁLISE CLÍNICA E MORFOLÓGICA	50
	4.6.1. ANÁLISE DO PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO	54
	4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5.	RESULTADOS.....	57
6.	DISCUSSÃO.....	66
7.	CONCLUSÃO.....	79

REFERÊNCIAS

APÊNDICE

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

O câncer de boca, juntamente com o de lábio e faringe, é o sexto mais comum no mundo (WARNAKULASURIYA, 2009; PRATESI et al., 2011). Seu tipo mais frequente é o carcinoma de células escamosas (CCE), representando mais de 90% dos cânceres da cavidade oral e cerca de 38% dos tumores malignos de cabeça e pescoço (COSTA et al., 2000; OGBUREKE, et al., 2007; WOLFF; FOLLMAN; NAST, 2012). Afeta preferencialmente homens entre a sexta e oitava década de vida (GAETTI-JARDIM et al., 2010; GRIMM, 2012; PIRES et al., 2013) e possui vários fatores etiológicos, porém o tabagismo e o etilismo, hábitos comuns em países ocidentais, contribuem para o desenvolvimento de mais de 75% dos CCE de cabeça e pescoço, incluindo câncer oral de faringe e laringe, mas os mecanismos da carcinogênese ainda não estão completamente esclarecidos (RIEDEL; GOESSLER; HORMANN, 2005; HUNTER; PARKINSON; THAKKER, 2011; WOLFF et al., 2012). A radiação solar ultravioleta, particularmente a do tipo UVB, é o principal fator etiológico envolvido no câncer de lábio, visto que é um potente carcinógeno que provoca dano direto ao DNA por meio da formação de radicais livres (SGARBI; CARMO; ROSA, 2007; SENA; COSTA; FERREIRA, 2013).

Existem vários mecanismos envolvidos no processo da carcinogênese e progressão tumoral, destes o sistema imune exerce papel fundamental relativo à vigilância imunológica, no qual pode haver o reconhecimento e destruição de clones de células com transformação maligna (OSTRAND-ROSENBERG, 2008). As células do sistema imune capazes de destruir células tumorais são os linfócitos TCD8+ citotóxicos (CTLs), células NK e macrófagos ativados (ZAMAI et al., 1998; KLIMP et al., 2002; LIN et al., 2008). Evidências sugerem que as células TCD4+ auxiliares (Th1 e Th17) desempenham papel central na iniciação e manutenção da resposta imune na vigilância tumoral (ALIZADEH; KATSANIS; LARMONIER, 2014).

Os primeiros relatos sobre um novo tipo de célula T auxiliar, a célula Th17, datam de 2005 (HARRINGTON; MANGAN; WEAVER, 2005). Isso levou a mudança do clássico paradigma de diferenciação das células T auxiliares em células Th1 e Th2, além de facilitar o entendimento da imunidade humana sob condições fisiológicas e patológicas (HARRINGTON; MANGAN; WEAVER, 2006; BETTELLI et al., 2007). As células Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17, expressão do fator de transcrição ROR γ t e o

desempenho de funções biológicas específicas (BETTELLI et al., 2007; KORN et al., 2009). A função das células Th17 na imunidade adaptativa é bem estabelecida, uma vez que exerce papel fundamental na resposta contra microrganismos extracelulares (fungos e bactérias) através do recrutamento de neutrófilos, que fagocitam e destroem estes microrganismos (TESMER et al., 2008). Além disso, exerce importante função na patogênese de muitas doenças inflamatórias e autoimunes, como psoríase, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide e esclerose múltipla (PERNIS, 2009; BRUCKLACHER-WALDERT et al., 2009; KAGAMI et al., 2010).

O papel das células Th17 na imunidade tumoral ainda não foi totalmente elucidado (BRONTE, 2008; MIYAHARA et al., 2008, KRYCZEK et al., 2009a; SU et al., 2010; GAUR et al., 2012; YE et al., 2012). Estudos apontam sua presença no infiltrado inflamatório tumoral de diversos tipos de cânceres (KRYCZEK et al., 2007; SU et al., 2010; YE et al., 2012), porém não há consenso sobre sua atividade pró-tumoral ou antitumoral (BRONTE, 2008). O papel dual das células Th17 no microambiente tumoral também se faz presente em pacientes com CCEO. Segundo Li et al. (2011), as células Th17 podem estar envolvidas na progressão do crescimento tumoral e no desenvolvimento de metástases. Gaur et al. (2012) encontrou alta frequência de células Th17 em pacientes com estágio inicial do câncer e sem envolvimento de linfonodos.

Diante do exposto e da escassez de pesquisas sobre a influência da linhagem Th17 em CCE de lábio inferior e língua, o propósito desse trabalho foi pesquisar a presença da IL-17 e do ROR γ t intratumoral em CCE nestas localizações, relacionando sua imunoexpressão com parâmetros clínicos e morfológicos nas amostras de lábio e língua e com o estadiamento clínico nos casos de língua. Com os resultados obtidos, aspira-se melhor compreender o papel das células Th17 na imunidade tumoral dos CCEs de lábio e língua.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE BOCA

O câncer é um evidente problema de ordem pública mundial (INCA, 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, além de 75 milhões de pessoas vivas com essa doença. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, é de 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Relativo ao câncer oral, a última estimativa mundial apontou que, para o ano de 2012, ocorreriam cerca de 300 mil novos casos e 145 mil óbitos por câncer de boca e lábio. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 são de 15.290 novos casos dessa doença em homens e mulheres (INCA, 2014).

O tipo mais comum de câncer oral é o carcinoma de células escamosas oral (CCEO) também chamado de carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular (OGBUREKE et al., 2007 e WOLFF; FOLLMAN; NAST, 2012). Caracteriza-se por apresentar altas taxas de invasão local e metástase, possuindo, portanto, grande agressividade. Muitos pacientes morrem em decorrência da disseminação local ou regional da doença (OGBUREKE et al., 2007). O CCEO afeta preferencialmente homens acima dos 50 anos de idade (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011), entretanto sua prevalência entre indivíduos mais jovens (com menos de 45 anos) tem aumentado (GAETTI-JARDIM et al., 2010; JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011). O principal sítio de acometimento é a língua e o assoalho (SANTOS et al., 2010; PATEL et al., 2011; POESCHL et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; FRONIE et al., 2013). As localizações geográficas influenciam nos sítios anatômicos de acometimento, visto que isso reflete os diferentes fatores a que uma determinada população está exposta (ANTUNES et al., 2007). A língua tem sido o principal sítio de acometimento na Inglaterra, Estados Unidos e Coréia provavelmente pelo consumo associado de tabaco e álcool (OLIVER; HELFRICK; GARD, 1996; SASAKI et al., 2005; CHOI et al., 2006). Na Ásia, a mucosa jugal é a localização mais comum devido ao hábito de mascar betel (FRITZ et al., 2000; IAMAROON et al., 2004). Em países tropicais a população é bastante exposta à radiação solar, levando a alta incidência de CCE de lábio inferior (COSTA et al., 2002).

A localização anatômica do CCEO é fator de influência no prognóstico, considerando-se que os tumores apresentam comportamento clínico diferente conforme sua localização (COSTA et al., 2002). Os tumores localizados em lábio representam 25% de todos os tumores da cavidade oral, sendo o lábio inferior o sítio mais acometido (mais de 80% dos casos) (ANTUNES; ANTUNES, 2004). O principal fator etiológico é a exposição crônica a radiação solar ultravioleta, especialmente o UVB (SOUZA et al., 2011; OSTERNE et al., 2011). Fatores relacionados a estilo de vida, sócio-demográficos, imunossupressão e susceptibilidade genética podem produzir efeitos sinérgicos (BRENER et al., 2007; VAN LEEUWEN et al., 2009; SENA et al., 2010; SOUZA et al., 2011). O CCE de lábio pode se apresentar de três tipos de forma clínica: exofítico, úlcero-infiltrativo e verrucoso (ANTUNES; ANTUNES, 2004). Esse tipo de lesão está associada com a mais baixa taxa de incidência de metástases cervicais entre todos os cânceres da cavidade oral (VARTANIAN et al., 2004). Para Sena et al (2010) o diagnóstico precoce e sem dificuldade para o especialista contribui para um melhor prognóstico, o que pode explicar seu elevado índice de sobrevida. A língua é o local da cavidade oral mais acometido pelo CCEO (BRENER et al., 2007), sendo a borda lateral o sítio mais afetado (SANTOS; BATISTA ODE; CANGUSSU, 2010). Os principais fatores de risco para seu desenvolvimento na língua é o fumo do tabaco e o álcool, além da infecção pelo HPV e deficiência imune. Diferentemente dos tumores de lábio, aqueles em língua tendem a ser mais agressivos e infiltrativos, possuindo, portanto, pior comportamento (HORA, 2001; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014) e taxa de sobrevivência de somente 37% em tumores no estágio IV (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Clinicamente, a apresentação do CCEO é variada, podendo apresentar-se como uma lesão exofítica ou endofítica, podendo ser leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica em estágios mais iniciais (SILVA; AMARAL; BULHOSA, 2010). Porém, há evidências clínicas que auxiliam no diagnóstico do CCEO, tais como: lesões de início indolor, que não cicatrizam espontaneamente em 15 dias, lesões ulceradas de bordas endurecidas e evertidas e com ausência de halo eritematoso (GAETTI-JARDIM et al., 2010).

A cavidade oral, por ser de fácil acesso para exame, permite visualização direta de alterações suspeitas, principalmente nos estágios iniciais, o que leva ao diagnóstico precoce de qualquer patologia. Porém, mesmo assim, o diagnóstico do câncer de boca muitas vezes é realizado tardiamente. Isso ocorre não só porque o paciente demora a procurar tratamento especializado, visto que a lesão possui características indolores em seu estágio inicial, mas também devido à apresentação clínica variada, o que exige preparo do cirurgião-dentista (SANTOS; BATISTA ODE; CANGUSSU, 2010). Assim, muitos pacientes morrem por

disseminação local ou regional da doença (OGBUREKE et al., 2007). Portanto, o tempo decorrido entre a percepção dos sintomas, o diagnóstico e o tratamento correto interfere não só no prognóstico, mas também na qualidade de sobrevivência dos pacientes (SCOTT; MCGURK; GRUNFELD, 2008).

No que concerne a etiologia do CCEO, sabe-se que é complexa, visto que pode ser induzida por uma combinação de vários fatores, dentre eles: hábitos pessoais, atividade profissional, local onde o indivíduo habita, problemas nutricionais, radiação, presença de oncogenes, predisposição e susceptibilidade genética, porém o consumo de fumo e álcool são os principais fatores de risco para essa doença (PETTI, 2009; MANNARINI et al., 2009; JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; WOLFF; FOLLMAN; NAST, 2012).

A carcinogênese originada pelo tabaco é dose dependente, isto é, o risco de desenvolver câncer é proporcional tanto ao número de cigarros fumados por dia quanto ao tempo de fumo (HASHIBE et al., 2007 e PETTI, 2009). Assim, o risco para câncer de cabeça e pescoço aumenta, significativamente, quando se fuma por mais de 20 anos e com frequência maior do que 20 cigarros por dia (HASHIBE et al., 2007; APPLEBAUM et al., 2007).

A carcinogênese do tabaco é inquestionável, visto que cerca de 25% dos casos de câncer oral são atribuídos ao uso do tabaco (fumado e/ou mascado) (PETTI, 2009). Porém, quando o hábito de fumar está associado ao etilismo, há efeitos sinérgicos à carcinogênese do tabaco. Estudo realizado por Znaor et al., (2003) constatou que o consumo de álcool juntamente com o hábito de fumar aumentava em quase 5 vezes a chance do indivíduo ser acometido pelo câncer de boca. Porém, o etilismo, de forma isolada, não pode ser considerado como fator de risco para o câncer oral. Estudo de caso controle realizado por Hashibe et al., (2007) aponta que o consumo de álcool não aliado ao hábito de fumar tem fraca associação com câncer de cabeça e pescoço. O mecanismo envolvido na carcinogênese propiciada pelas bebidas alcoólicas está relacionado à presença de acetaldeído oriundo do metabolismo enzimático do etanol. Tal substância possui efeitos mutagênicos no DNA da célula do hospedeiro (SEITZ; STICKEL, 2007). Além disso, o etanol atua nas células do epitélio bucal tornando-as mais permeável a outros carcinógenos como, por exemplo, os presentes no tabaco (ROSENQUIST, 2005; SUBAPRIYA et al., 2007).

O CCE de cabeça e pescoço apresenta outro fenótipo clínico e fatores etiológicos diferentes do convencional, já que, muitas vezes, se apresentam em indivíduos sem exposição significativa ao álcool e tabaco. Um dos principais fatores contribuintes apontados é o HPV, porém predisposição genética e síndromes hereditárias (anemia de Fanconi e Síndrome de Boom) também foram identificados (MONSJOU et al., 2013). Dentre os pacientes acometidos

pelo câncer de boca, 15% a 20% deles não estão expostos a esses fatores de risco, sendo a etiologia, nesses casos, portanto, desconhecida (SIEBERS et al., 2008; MANNARINI et al., 2009; VARGAS-FERREIRA et al., 2012). Uma associação viral, principalmente com o vírus HPV (papiloma vírus humano) 16 e 18, que são comprovadamente carcinogênicos, tem sido atribuída como fator causal do CCEO nesse grupo em particular (OLIVEIRA et al., 2003; SIEBERS et al., 2008; MANNARINI et al., 2009; FELLER et al., 2010; KANSY; THIELE; FREIER, 2012). O HPV contém o DNA como material genético, é epitéliotrópico e tem a pele e as mucosas como principais sítios de infecção (OLIVEIRA et al., 2003; VARGAS-FERREIRA et al., 2012). Acredita-se que o mecanismo envolvido em sua carcinogênese esteja relacionado com duas proteínas (E6 e E7) codificadas por ele (OLIVEIRA et al., 2003). A E6 liga-se, sequestra e degrada a p53, proteína importante na proteção do genoma celular, por um caminho ubiquitina-dependente, além de suprimir a apoptose (SCHEFFNER et al., 1990; SUMMERSGILL et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Já a E7, sequestra a proteína pRb, que é supressora tumoral (OLIVEIRA et al., 2003). Porém, a hipótese mais provável do papel do HPV na carcinogênese oral não é sua presença de forma isolada, mas sim interagindo sinergicamente com outros carcinógenos (OLIVEIRA et al., 2003).

Outro fator etiológico importante relacionado ao câncer de boca é a imunossupressão. De acordo com Dunn et al., (2002), sem ataque imunológico efetivo, as células malignas não podem ser reconhecidas e destruídas. Porém as células tumorais possuem várias propriedades que permitem escape das defesas do hospedeiro (SWANN; SMYTH, 2007; LANGOWSKI; KASTELEIN; OFT, 2007), incluindo ativação de célula T na ausência de co-estimulação adequada, resultando em anergia (SCHWARTZ, 2003), expressão de moléculas inibidoras de células T como B7-H1 (DONG et al., 2002), HLA-G (TRIPATHI; AGRAWAL, 2006) e HLA-E (DERRE et al., 2006), super-expressão das moléculas anti-apopóticas FLIP (KATAOKA et al., 1998) e BCL-XL (HINZ et al., 2000); secreção pelas células tumorais de produtos que suprimem a resposta imunológica, como o TGF- β , que inibe a proliferação e as funções efetoras dos linfócitos e macrófagos (GORELIK; FLAVELL, 2001) e perda do antígeno tumoral ou baixa expressão da moléculas MHC de classe II, sem as quais não há ativação das células T auxiliares que, em algumas situações, estimulam a diferenciação dos CTLs (CAMPOLI; CHANG; FERRONE, 2002).

Histopatologicamente, o CCE caracteriza-se por uma desordem proliferativa de células da camada espinhosa do epitélio, que expressa graus variados de similaridade com suas células de origem. As células exibem citoplasma bastante eosinofílico, núcleo vesicular de tamanho aumentado com hiper cromatismo, pontes intercelulares proeminentes, aumento do número de

figuras de mitoses típicas ou atípicas, pleomorfismo celular e nuclear e pérolas de ceratina. Estas células invadem o tecido conjuntivo de forma isolada ou em grupos, formando cordões, ninhos e lençóis. (NEVILLE et al., 2009; BATISTA et al., 2010). Destaca-se, ainda, a presença de degeneração basofílica das fibras colágenas, denominada elastose solar nos casos de CCE de lábio (NEVILLE et al., 2009).

Com intuito de caracterizar o tumor, prever o prognóstico e propor a terapia mais adequada para cada caso criou-se o sistema de estadiamento clínico de tumores (TNM). Nela se observa o tamanho do tumor e a extensão da disseminação metastática (SOBIN et al., 2009). Entretanto, esse método vem sendo considerado falho para a determinação generalizada do prognóstico do CCEO (BETTENDORF; PIFFKÓ; BÁNKFALVI, 2004). O uso de sistemas de gradação histológica de malignidade, para este mesmo fim, vem sendo amplamente estudada e alguns resultados satisfatórios vêm sendo obtidos (ANNEROTH; HANSEN; SILVERMAN, 1986a; ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1986b; BRYNE et al., 1989; KADEMANI et al., 2005; WOOLGAR et al., 2006).

Um dos sistemas de gradação mais utilizados é o de Bryne et al. (1998). Esse sistema é específico para o “front” invasivo de CCEO e é baseado em uma série de parâmetros (grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário). São atribuídos escores numéricos de 1 a 4 para cada característica analisada, priorizando o “front” invasivo. Ao final da análise, os escores são somados e se obtém o grau de malignidade do tumor, onde quanto maior o escore, pior o prognóstico.

2.2 RESPOSTA TH17

A resposta imune está dividida em inata e adaptativa. A imunidade inata (natural ou nativa) é a linha de defesa inicial contra microrganismos. A mesma atua de maneira inespecífica e mantém-se inalterada com as repetidas exposições ao mesmo agente (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A imunidade adaptativa possui notável especificidade para moléculas distintas, além de capacidade de memória, respondendo mais intensamente a exposições repetidas ao mesmo antígeno (ABBAS, 2012).

Existem dois tipos de respostas imunes adaptativas: a imunidade humoral (mediada por anticorpos, produzidos pelos linfócitos B) e a celular (mediada pelos linfócitos T auxiliares e citotóxicos). As células T dividem-se em duas classes principais, de acordo com as proteínas de superfície celular que expressam (CD4 e CD8) e possuem funções efetoras distintas. Essas

células diferem na classe de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que reconhecem, o qual pode ser de classe I e II. O MHC, por sua vez, possui estrutura e padrão de expressão diferente nos tecidos do corpo. Assim, a proteína de superfície celular CD4 se liga à molécula de classe II (presente nas células dendríticas, linfócitos B, macrófagos e outros tipos celulares como células epiteliais e endoteliais do timo) enquanto que CD8 se liga a molécula de classe I (presente em praticamente todas as células nucleadas) (ABBAS, 2012).

A diferenciação das células T CD4⁺ virgens em efetoras inicia-se através da ligação do receptor das células T (TCR) e de moléculas coestimuladoras (como CD40, CD28 e CD36) na molécula de MHC de classe II presente nas células apresentadoras de antígenos (APCs) juntamente com a presença de citocinas específicas produzidas pela imunidade inata (TAO et al., 1997 e ABBAS, 2012). Em seguida, há a polarização das células T auxiliares, diferenciando-se em Th1, Th2, Th17 e Treg (LUCKHEERAM et al., 2012).

A diferenciação para o fenótipo Th1 se dá na presença de IFN γ (advindo das células “natural killer” em respostas a microrganismos) que ativa o fator de transcrição STAT1, o qual estimula expressão de T-bet (regulador mestre da diferenciação de Th1). A IL-12 (geradas pelas células dendríticas e macrófagos em respostas a microrganismos), por sua vez, ativa o fator de transcrição STAT4 que intensifica mais a produção de IFN γ , formando uma alça de amplificação positiva que induz a diferenciação das células T em direção ao fenótipo Th1. A polarização para o fenótipo Th2 se dá na presença de IL-4 (advinda dos mastócitos e eosinófilos particularmente em resposta a helmintos) que ativa os fatores de transcrição STAT6 e GATA-3 (regulador mestre da diferenciação Th2). A IL-4, também produzida pelas próprias células Th2, amplifica essa resposta e inibe o desenvolvimento de outros fenótipos (Th1 e Th17) (KORN et al., 2009).

Em 2005, o paradigma clássico da diferenciação das células T auxiliares em Th1/Th2 foi mudado devido à descoberta das células Th17 (HARRINGTON et al., 2005). A polarização para o seu fenótipo se dá na presença das citocinas IL-6, IL-1 e IL-23 (advindas das células dendríticas que respondem a patógenos particulares, como bactérias e fungos, ou endocitam células do hospedeiro que sofreram apoptose). Estas ativam o fator de transcrição STAT3 que juntamente com o ROR γ t (*Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t*) induzem a resposta tipo Th17 (IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2009; ABBAS, 2012). Depois de diferenciadas as células Th17 secretam IL-21 que juntamente com TGF- β induz a expressão de ROR γ t, amplificando a resposta Th17 (KORN et al., 2007). A polarização Th17 pode ser favorecida também indiretamente através do TGF- β , pois, por ser um supressor

potente da diferenciação dos fenótipos Th1 e Th2, remove o efeito inibidor desses dois tipos celulares permitindo a polarização para o fenótipo Th17 (ABBAS, 2012). A IL-23 atua também estabilizando a diferenciação das células Th17, além de conduzir à maturação das mesmas (KORN et al., 2007).

A resposta das células TCD4⁺ é essencial para o combate a infecções. As células Th1 protegem as células contra bactérias intracelulares, as Th2 desempenham papel contra os parasitas e as células Th17 eliminam bactérias extracelulares e fungos (D'ELIOS et al., 2011). As citocinas produzidas pelas células Th17 possuem importantes ações na defesa do hospedeiro contra infecções. A principal ação efetora das células Th17 é induzir, através da IL-17, inflamação neutrofílica, destruindo bactérias e fungos extracelulares. A defesa antiviral do hospedeiro contra vírus é mediada principalmente por células Th1 e T CD8⁺, porém recentes evidências sugerem que vírus podem também induzir resposta Th17 (VAN DE VEERDONCK et al., 2009; ABBAS, 2012).

A ativação de células T CD4⁺ direcionadas a um antígeno autólogo pode levar a autoimunidade. Quando o paradigma de diferenciação de células T CD4⁺ virgens restringia-se ao fenótipo Th1 e Th2, a excessiva polarização para o fenótipo Th2 associava-se ao desenvolvimento de alergias, enquanto que para o fenótipo Th1 a autoimunidade e, em particular, a síndromes autoimunes. Esses distintos tipos de respostas imunes estão ligadas aos diferentes perfis de citocinas secretadas pelos subconjuntos de células T (PERNIS, 2009).

O conceito de autoimunidade condicionado às células Th1 foi mudado quando se tornou claro que camundongos deficientes em IFN- γ e em receptor de IFN- γ , bem como aqueles que careciam de moléculas envolvidas na diferenciação no fenótipo Th1, não estavam protegidos da encefalomielite autoimune (TRAN, PRINCE, OWENS, 2000; ZHANG et al., 2003). Estudo realizado por Langrish et al. (2005) mostrou que a IL-23 expandia/gerava células T produtoras de IL-17, a qual era capaz de induzir encefalomielite autoimune em camundongos selvagens. A IL-17 é a citocina de assinatura da célula Th17 e faz parte de uma grande família de moléculas pró-inflamatórias (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-25 e IL-17F) (KOLLS; LIDÉN, 2004; TESMER et al., 2008). Tanto a IL-17A quanto a IL-17F são responsáveis pelo recrutamento, ativação e migração de neutrófilos. A IL-17A também regula a formação de centros germinativos e a produção de autoanticorpos. Sobre certas condições, as células Th17 e suas moléculas efetoras (IL-17, IL-21, IL-22, GM-CSF e CCL20) estão associadas com a patogênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias, como: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase, doença intestinal inflamatória, alergia e asma (MADDUR et al., 2012).

Conhecer os tipos celulares que estão presentes no infiltrado inflamatório tumoral de diversos tipos de câncer é fundamental, pois o sistema imune atua na oncogênese, na progressão tumoral e na resposta a terapia anti câncer (SENOVILLA et al., 2012). As principais células do sistema imune que tipicamente estão presentes no estroma tumoral são macrófagos associados ao tumor e células T, constituindo, assim, uma reação de células inflamatórias mononucleares (CHEN et al., 2012a). As células Th17 encontram-se presentes no infiltrado inflamatório tumoral de diversos tipos de cânceres humanos (KRYCZEK et al., 2007; KRYCZEK et al., 2009a; KESSELRING et al., 2010; SU et al., 2010; TOSOLONI et al., 2011; YE; LIVERGOOD; PENG, 2013), porém seu papel na imunidade tumoral é controverso, visto que alguns estudos apontam para uma atividade pró-tumoral, enquanto outros mostram uma ação antitumoral. Isso dependerá da imunogenicidade do tumor, do estado imune do hospedeiro e da atividade angiogênica dos membros da família IL-17 (KOLLS; LÍDEN, 2004).

De acordo com Ye; Livergood; Peng (2013), a atividade pró-tumoral da IL-17 e Th-17 tem sido observada tanto em modelos tumorais de animais quanto em cânceres humanos. Os mecanismos responsáveis envolvem principalmente a angiogênese e a indução de citocinas no microambiente tumoral, resultando em crescimento do tumor. Estudo realizado por Numasaki et al. (2003) com adenocarcinoma de cólon em modelo animal mostrou os efeitos pró-tumorais da IL-17, onde esta induzia vários fatores angiogênicos (VEGF, PGE2, quimicocinas derivadas de queratinócitos e óxido nítrico) a partir dos fibroblastos e das células do tumor. Achados semelhantes foram descritos, posteriormente, em pesquisa realizada por Numasaki et al. (2005) com câncer de pulmão de células não pequenas em modelo animal, o qual demonstrou que a IL-17 aumenta a atividade angiogênica promovendo, *in vivo*, o crescimento tumoral através de um mecanismo dependente da quimicocina angiogênica CXCR2. Estudo realizado por Nam et al. (2008) com câncer de mama em modelo animal encontrou que a IL-17 suprime a apoptose de células tumorais *in vitro*, indicando que a polarização para o fenótipo Th17 tem potencial para promover a gênese tumoral diretamente. Outras pesquisas em modelo animal também mostraram que as células Th17 pareciam ser necessárias para o desenvolvimento do câncer (LANGOWSKI et al., 2006; LANGOWSKI; KASTELEIN; OFT, 2007).

Muitos estudos em pacientes com diversos tipos de câncer humano também demonstraram o efeito pró-tumor da IL-17 ou das células Th17. Sfanos et al. (2008), sugeriram que as células Th17 e/ou as células Treg podem estar envolvidas no desenvolvimento e na progressão do câncer de próstata nos seres humanos. Tosolini et al.

(2011) analisaram 125 espécimes de câncer colorretal detectaram um pobre prognóstico entre aqueles pacientes com alta expressão do conjunto de genes Th17, enquanto que pacientes com alta expressão do conjunto de genes Th1 tinham prolongada sobrevida livre da doença. Su et al. (2010) constataram que as células Th17 presentes no infiltrado inflamatório tumoral de amostras de câncer de mama, cólon e melanoma, promoveram o crescimento do tumor em um sistema de cultura *in vitro*. Zhang et al. (2009) em amostras de carcinoma hepatocelular mostraram que o acúmulo intra-tumoral de células produtoras de IL-17 promoviam o crescimento da lesão através do aumento da angiogênese.

Pesquisa realizada por Greten et al. (2012) em pacientes com carcinoma hepatocelular encontrou efeitos imunossupressores relacionados às células Th17. Essa pesquisa demonstrou que as células Th17 estavam aumentadas em amostras do sangue periférico de pacientes acometidos por essa patologia e que as mesmas suprimiam as funções das células T CD8⁺ *in vitro*. Wu et al. (2009) encontraram que a frequência de células Th17 estava significativamente aumentada em amostras de sangue periférico de pacientes com leucemia mielóide aguda sem tratamento quando comparado com as amostras de voluntários saudáveis. Além disso, a frequência de células Th17 era reduzida quando os pacientes, depois da quimioterapia, atingiam remissão completa da patologia. Em pacientes com mieloma múltiplo, a elevada produção da IL-17 pelas células Th17 promovia o crescimento das células do mieloma e inibiam as funções imunes efetoras. Para Shi et al. (2013) terapias alvo direcionadas contra IL-17A pode ser uma estratégia bioterapêutica para a prevenção da tumorigênese colorretal e/ou no tratamento do câncer colorretal no futuro.

Outras citocinas, além da IL-17, relacionadas ao fenótipo Th17 também foram descritas exercendo atividade pró-tumoral. Estudo realizado por Ménoreth et al. (2008) mostrou que a IL-21, quando gerada a partir de colônias de mieloma, age favorecendo o crescimento tumoral. Em relação a IL-23, pesquisa em modelo animal aponta como uma citocina associada ao câncer por promover incidência e crescimento tumoral através da indução da angiogênese e da redução da infiltração de células T CD8⁺ para o microambiente do tumor (LANGOWSKI et al., 2006).

Apesar de muitos estudos demonstrarem o papel das células Th17 em promover o crescimento tumoral, muitas evidências sugerem que essas células podem ter um potente efeito antitumoral. Modelos de tumores em murinos têm mostrado que as células Th17 podem erradicar diretamente as células tumorais. Pesquisa realizada por Nuñez (2013) com ratos deficientes em ROR γ t mostrou diminuição da porcentagem de células Th17, promovendo o crescimento de melanomas B16. Benchetrit et al (2002) mostraram que a IL-17, quando

transplantada em ratos imunocompetentes, inibia as taxas de crescimento de dois tipos de tumores hematopoiéticos através do aumento de células T citolíticas tumor específicas. Estudo com modelo murino para câncer de cólon realizado por Kryczek et al. (2009b) constatou que ratos deficientes de IL-17 exibiam acelerado crescimento tumoral e mais focos de metástase quando comparado com ratos controle, sugerindo que a IL-17 endógena exerce papel protetor na imunidade antitumoral. Pesquisa realizada por Martin-Orozco et al. (2009) em modelo animal mostrou crescimento tumoral em camundongos deficientes em IL-17. O mesmo estudo, ao utilizar transferência adotiva de células Th17 para prevenção e tratamento de tumores em animais, constatou que as células Th17 desencadeiam uma forte resposta T CD8⁺, além de promover a infiltração de células dendríticas para o tumor e apresentação de antígenos tumorais nos linfonodos que drenam o tumor.

De acordo com Ye; Livergood; Peng. (2013) a maioria dos dados que sustentam a teoria de que as células Th17 possuem papel antitumoral advém de modelos murinos, não estando completamente definido sua função na imunidade antitumoral humana. Estudo realizado por Kryczek et al. (2009a) em 201 pacientes com câncer de ovário concluiu que as células Th17 podem ter efeito protetor na imunidade tumoral em humanos por induzir quimiocinas tipo Th1 (CXCL9 e CXCL10), resultando no recrutamento de células T efetoras para o microambiente tumoral. Os mesmos autores constataram, ainda, que, no estágio avançado da doença, a presença de células Th17, no infiltrado inflamatório tumoral, estava reduzida e que baixos níveis de IL-17 estavam associados com pior prognóstico. Ye et al. (2010) mostraram que o acúmulo de células Th17 em pacientes com câncer de pulmão predizia melhor sobrevivência. Pesquisa realizada por Cunha et al. (2012) com 398 pacientes com câncer de tireóide encontrou associação entre a infiltração de células Th17 com bom prognóstico. O mecanismo de ação das células Th17 no câncer não foi ainda elucidado, mas sua habilidade de causar inflamação (o que levaria a uma maior apresentação de antígenos pelas células dendríticas) e destruição tecidual pode ser o fator chave na terapia contra o câncer, atacando células tumorais (MURANSKI et al., 2008; MARTIN-OROZCO et al., 2009).

Em relação ao papel das células Th17 em CCEO muito pouco é conhecido (KESSELRING et al., 2010). Estudos mostram que, assim como em outros tipos de câncer, sua ação é ambígua, podendo ser pró-tumoral ou antitumoral (COSTA et al., 2012). Pesquisa em modelo animal detectou que as células Th17 estavam aumentadas em lesões orais pré-malignas, quando comparadas com o grupo controle e que sua frequência caía em camundongos com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. De acordo com os pesquisadores, isso pode indicar uma resposta antitumoral das células Th17 durante o

desenvolvimento precoce do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (COSTA et al., 2012). Pesquisa realizada por Gaur et al. (2012) com amostras de sangue periférico de 45 pacientes diagnosticados com CCEO encontrou alta frequência de células Th17 em pacientes no estágio inicial da doença e sem envolvimento linfonodal. Esse estudo mostrou ainda que as células Th17 possuíam relação com a imunidade antitumoral, pois as mesmas estavam relacionadas de forma quantitativa direta com células T CD4⁺ e T CD8⁺. Kesselring et al. (2010), através da citometria de fluxo, estudaram a presença e a indução de células Th17 em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e detectaram que a proliferação e a angiogênese tumoral era dificultada na presença de células Th17.

Li et al. (2011) em estudo com amostras de sangue periférico de 67 pacientes com câncer de cabeça e pescoço detectaram que havia maior frequência de células Th17 em pacientes com estágio avançado da doença, quando comparado com aqueles em estágio inicial do tumor. Além disso, foi detectada maior frequência de células Th17 em pacientes com metástase linfonodal. A mesma pesquisa mostra ainda que a expressão de IL-17, principal citocina relacionada ao fenótipo Th17, pode ser detectada em estágios bem precoces do tumor e aumenta gradualmente com a progressão tumoral. Independente do papel das células Th17 no microambiente tumoral sua presença influencia bastante no comportamento do tumor, visto que, de acordo com pesquisa realizada por Kesselring et al. (2010), carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço expressam todos os receptores de citocinas necessários para responder às citocinas secretadas pelas células Th17 (IL-17R, IL-21R e IL-22R).

De acordo com Lakshmi Narendra et al. (2013), a mais provável razão para esses achados controversos, relativos ao papel das células Th17 em diversos tipos de câncer, é a plasticidade das células Th17, visto que as mesmas podem se diferenciar em células semelhantes a Th1, que expressam T-bet e produzem IFN- γ ou em células Treg que expressam Foxp3.

O papel da célula Th1 no câncer já é melhor compreendido, visto que a mesma pode regular programas antitumorais tanto diretamente (através da secreção de altos níveis de IFN- γ e TNF- α capazes de regular positivamente a apresentação de moléculas de MHC de classe I e II pelas APCs, colaborar com as funções de morte celular das células T CD8⁺ e regular a duração e magnitude da resposta das CTLs) quanto indiretamente (ativando e expandindo as CTLs que eliminam o tumor através de moléculas de perforina e granzima) (LAKSHMI NARENDRA et al., 2013).

As células Th17 semelhantes a Th1 têm importante implicação não só para a defesa do hospedeiro, mas também possuem impacto em certas doenças mediadas imunologicamente e na resposta antitumoral (BASU; HATTON; WEAVER, 2013), onde sua funcionalidade *in*

in vivo permanece, ainda, pobremente definida (MURANSKI et al., 2011). Muranski et al. (2008) desenvolveu um modelo de rato transgênico no qual as células T CD4⁺ reconhecem especificamente um epítipo presente tanto em melanócitos normais quanto em melanoma murino B16. Nessa pesquisa foi possível observar que a destruição tumoral é dependente da expressão de T-bet e IFN- γ por células Th17 que são convertidas em células semelhantes a Th1. Além disso, inesperavelmente, essas células possuíam um efeito antitumoral mais potente do que as células Th1. A secreção de INF- γ por células Th17 não fica restrita a modelos animais, pesquisa realizada por Kryczek et al (2009a) em amostras de câncer humano de fígado, cólon, ovário, pâncreas e melanoma mostrou que as células Th17 também expressavam altos níveis não somente de INF- γ , mas também de TNF- α e IL-2. Su et al., (2010) em amostras de câncer humano de mama, cólon e melanoma demonstraram, através do perfil de citocinas determinado por ELISA, a presença de poucos clones de células Th17 semelhantes a Th1 que secretavam tanto IFN- γ quanto IL-17.

As células Treg também exercem um papel dual na carcinogênese (LAKSHMI NARENDRA et al., 2013). Evidências sugerem que células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ contribuem para a supressão imune diminuindo a imunidade antitumoral pelas células T CD8⁺, células dendríticas e células NK. Dessa maneira, tentativas para bloquear ou eliminar tais células em câncer tem sido feitas através da quimioterapia (FENG; WANG, 2010). Pesquisa realizada por Badoual et al. (2006) com 84 casos de carcinoma primário de cabeça e pescoço mostra que o infiltrado inflamatório tumoral com células T CD4⁺ Foxp3⁺ estão positivamente correlacionadas com um melhor controle loco regional da doença. Para os autores o papel das células Treg difere de acordo com o estágio clínico do tumor. Yu et al. (2005) mostraram a frequência aumentada dessas células durante a progressão tumoral e sua depleção *in vivo* é eficiente para erradicar tumores estabelecidos durante as fases finais da resposta imune antitumoral.

As células Th17 exercem uma plasticidade recíproca com as células Treg caracterizada pela população linfocítica de fenótipo T CD4⁺ IL-17⁺ Foxp3⁺. Porém, ainda não é claro se essa população celular é derivada das células Th17 ou Treg (Ye; Livergood, Peng, 2013). Pesquisa realizada por Su et al. (2010) em amostras de câncer humano de mama, cólon e melanoma encontrou que as células Th17 presentes no microambiente tumoral também expressavam CTLA-4, CD25 e Foxp3, marcadores característicos de células Treg. Recentemente, estudos realizados por Kryczek et al. (2011) e Huang; Fu (2011) descobriram populações IL-17⁺FOXP3⁺CD4⁺ em câncer de cólon e esôfago, respectivamente. Ambos os estudos encontraram evidências que associam a presença dessas células com o

desenvolvimento do câncer. Segundo os autores, as células Th17 podem alterar seu fenótipo para célula Treg Foxp3⁺ e passam a exercer efeito regulatório negativo sobre o sistema imune. Para Li; Boussiotis (2013) o papel preciso das células Foxp3⁺ IL-17⁺ e Foxp3⁺ e RORγt⁺ é ainda discutível, porém a maioria dos estudos concorda que as mesmas suprimem a atividade antitumoral e promove o crescimento do tumor. Para Ma; Dong (2013) as células T IL-17⁺ Foxp3⁺ podem ser o novo alvo terapêutico no tratamento de câncer de cólon. Nesta pesquisa, esse subconjunto de células T estavam mais aumentadas em mucosa de cólon afetada pelo câncer do que nas amostras saudáveis e as mesmas foram capazes de suprimir as células T CD8⁺.

A geração desses tipos celulares de células Th17 (semelhante a célula Th1 e semelhante a célula Treg) é ainda desconhecido, visto que não se sabe se é dependente do estágio da doença, do tipo de tumor ou variações no microambiente celular (Ye; Livergood, Peng, 2013).

Estudos sugerem diversos mecanismos que seriam responsáveis pelo acúmulo das células Th17 no infiltrado inflamatório tumoral. De acordo com Ye; Livergood, Peng. (2013), um deles sugere que o microambiente tumoral usa mecanismos migratórios para recrutar seletivamente células Th17 da periferia para o tumor. Pesquisa realizada por Su et al. (2010) com amostras de três tipos de câncer (mama, cólon e melanoma) detectou que as células tumorais, bem como os fibroblastos derivados do tumor secretam grandes quantidades de MCP-1 e RANTES, os quais atraem fortemente células Th17 presentes no sangue periférico para o microambiente tumoral. Os mesmos autores afirmam que receptores da imunidade inata (TLRs e Nod) sinalizam para o aumento da expressão de MCP-1 e RANTES pelas células tumorais e pelos fibroblastos derivados do tumor, o que leva a uma maior migração de células Th17. Ye; Livergood; Peng. (2013) sugerem que a sinalização mediada pela inflamação crônica local e por infecções no local do tumor também pode contribuir para o acúmulo de células Th17 no microambiente tumoral.

Outro mecanismo ligado ao recrutamento de células Th17 para o microambiente tumoral se daria através dos receptores de tráfego. Uma limitada quantidade de informações está disponível em relação a esses receptores nas células Th17 (LIM et al., 2008). Alguns estudos sugerem que essas células expressam CCR6, CCR4 e CCR2 (SATO; ARANAMI; YAMAMURA, 2007; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007 e ANNUNZIATO et al., 2007). De acordo com Ye, Livergood; Peng. (2013) o CCR6 é expresso universalmente nas células Th17. Esta quimiocina permite a migração das células Th17 em tecidos inflamados em resposta a CCL20 (KESSELRING et al., 2010). Diferentes entidades tumorais superexpressam a quimiocina CCL20, o que facilitaria a migração de células Th17 para o

microambiente tumoral (RUBIE et al., 2006 e ZOU et al., 2010). Pesquisa realizada por Ye et al. (2010) mostrou que o recrutamento de células Th17 a partir do sangue periférico para o microambiente tumoral se dá através das quimiocinas CCL20 e CCL22 expressas em amostras de câncer de pulmão. Kesselring et al. (2010) em estudo com pacientes com CCEs de cabeça e pescoço mostraram que as células Th17 migram para o microambiente tumoral conduzida pelos receptores de quimiocinas CCR6 e pela quimiocina CCL20.

O microambiente tumoral possui um perfil de citocinas que promove a diferenciação e a expansão de células do tipo Th17. Pesquisa realizada por Miyahara et al. (2008) com sangue periférico e espécimes teciduais de pacientes com câncer de ovário mostraram que as células tumorais, os fibroblastos derivados do tumor e células apresentadoras de antígenos secretam várias citocinas chaves (IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β) que regulam e expandem a produção de células Th17. Resultados semelhantes foram descritos por Ye et al. (2010) em experimentos *in vitro*, os quais demonstraram que IL-1 β , IL-6 e IL-23 podem promover a geração de células Th17 e diferenciação a partir de células T CD4⁺ virgens em derrame de pleura maligno. Estudo realizado por Su et al. (2010) com amostras de câncer de mama humano, cólon e em melanoma mostrou um microambiente tumoral rico em IL-23 e IL-6, além de quantidades variáveis de TGF- β .

Outros fatores como, por exemplo, as células tumorais e aquelas derivadas do estroma do tumor, estão envolvidas na geração e diferenciação das células Th17 no microambiente tumoral (MIYAHARA et al., 2008; KRYCZEK et al., 2009a; SU et al., 2010). Pesquisa realizada por Kryczek et al. (2009a) em amostras de câncer de ovário, observou que os macrófagos associados aos tumores são capazes de induzir o desenvolvimento de células Th17 *in vitro*. Su et al., (2010) em amostras de câncer humano de cólon, mama e em melanoma detectaram que as células tumorais e os fibroblastos derivados do tumor secretam IL-23, TGF- β 1 e IL-1 β , promovendo, dessa maneira, um perfil de citocinas que levam a diferenciação e expansão de células do tipo Th17. Miyahara et al. (2008), demonstraram que a co-cultura de células T CD4⁺ virgens ou de memória com células de câncer de ovário e células apresentadoras de antígenos podem gerar altas porcentagens de células Th17. Além disso, o contato célula-célula tumoral gera sinalizações desconhecidas que promovem a diferenciação das células T CD4⁺ virgens em células Th17 (SU et al., 2010).

Relativo à geração de células Th17 no microambiente tumoral de cânceres de cabeça e pescoço, estudo realizado por Kesselring et al. (2010) detectaram que as células do infiltrado inflamatório tumoral liberam IL-1 β e que as células malignas do tumor secretam IL-6 e IL-23. A IL-1 β e IL-6 são necessárias para induzir o fenótipo Th17 e a IL-23 para expandir a

linhagem Th17. Lee et al. (2011) demonstraram que o CCEO constitui um microambiente inflamatório enriquecido por IL-1 β , IL-6 e TGF- β e que, portanto é propício para a geração de células Th17.

A prevalência de células Th17 em diversos tipos de câncer, inclusive em CCEO, deve ser investigado. Um melhor entendimento de sua natureza, regulação e função na imunidade tumoral pode ajudar a desenvolver uma nova e mais eficaz imunoterapia para o câncer oral.

3. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo identificar a presença ou ausência de células Th17 em amostras de CCE de lábio e língua através da expressão imunohistoquímica da IL-17 e ROR γ t nestas lesões. Além disso, relacionou-se a presença das células Th17 intratumorais com a gradação histológica de malignidade proposta por Bryne (1998) e com dados clínicos referentes ao TNM nos casos de língua, com o intuito de melhorar a compreensão do papel dessa população celular na patogênese do CCE de lábio e língua.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido ao Sistema Nacional de Ética na Pesquisa (SISNEP) e ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Conforme parecer nº 266.928 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi do tipo transversal, analítico e descritivo, sendo observado, analisado e registrado a expressão imunoistoquímica da IL-17 e ROR γ t em CCE de lábio e língua.

4.2.1 VARIÁVEIS

As variáveis analisadas nesse estudo foram categorizadas como dependentes (imunomarcção para IL-7 e ROR γ t) e independentes (gradação histológica de malignidade, localização anatômica e TNM).

4.3 POPULAÇÃO

A população objeto do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCE de língua diagnosticados e arquivados no Setor de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e todos os casos de CCE de lábio inferior registrados e diagnosticados nesse serviço quanto da Unidade Campinense de Diagnóstico, Campina Grande - PB.

4.4 AMOSTRA

A amostra foi intencional, pois foram selecionados todos os casos diagnosticados histologicamente como CCE localizado em lábio inferior ou língua arquivados nos serviços

anteriormente citados. Foram selecionados 40 casos de CCE de lábio inferior e 28 casos de CCE de língua.

4.4.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

4.4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra:

- Lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE), que tiveram diagnóstico histopatológico de CCE de lábio inferior ou de língua;
- Casos cujos blocos em parafina apresentou quantidade suficiente de material para realização do estudo imunoistoquímico;
- Casos cujos prontuários apresentaram todos os dados necessários para a realização do estudo clínico.

4.4.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra aqueles casos que não satisfizeram os critérios de inclusão anteriormente citados.

4.5 ANÁLISE CLÍNICA E MORFOLÓGICA

A partir de fichas clínicas de requisições de biópsias foram obtidas as seguintes características clínicas: sexo, idade, localização e TNM para os casos de língua. Ressalta-se

que a coleta dos dados clínicos foi realizada com auxílio de formulários elaborados para essa pesquisa (APÊNDICE B e C). Este instrumento foi validado em um período anterior à coleta de dados. A raça não foi considerada neste estudo, já que a população brasileira consiste de uma extensa mistura de Ameríndios, Europeus e Africanos (PARRA et al., 2003). Dessa forma, não existe uma categorização da raça que resulte em uma distribuição étnica verdadeira.

Os espécimes foram analisados sob microscopia de luz, nos aumentos de 40x, 100x e 400x através da análise de cortes histológicos de 5µm de espessura, corados pela técnica da Hematoxilina/Eosina para confirmação de diagnóstico e gradação histológica de malignidade (Quadro 1). O exame histopatológico do grau de malignidade foi realizado por um único examinador, o qual, antes do início do período experimental, recebeu treinamento referente à uniformização das variáveis investigadas.

	ESCORES DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Grau de ceratinização	Altamente ceratinizado (+ de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (de 20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (de 5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco pleomorfismo (+ de 75% de células maduras)	Moderado pleomorfismo (50-75% de células maduras)	Pleomorfismo intenso (25-50% de células maduras)	Pleomorfismo extremo (0-25% de células maduras)
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Dissociação celular espraída e pronunciada em pequenos grupos e/ou células individuais (n<15)
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Quadro 1. Sistema de gradação de malignidade “Modo de invasão” recomendado por Bryne (1998).

Como recomendado por Bryne (1998), a análise foi realizada no “front” de invasão. Foram atribuídos escores de 1 a 4 para cada parâmetro, conforme tal sistema. Os escores foram somados em cada caso. Os casos que obtiverem pontuação de 4 a 8 foram classificados em baixo grau de malignidade e aqueles com pontuação total superior a 8 em alto grau de

malignidade. Esta classificação consiste numa adaptação de Miranda (2002) da metodologia proposta por Bryne (1989). Os dados obtidos através dessa análise serão anotados em fichas individuais (APÊNDICE D).

4.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Os espécimes fixados em formol a 10% e emblocados em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de Organosilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Na técnica imunoistoquímica foi empregado o complexo Avidina biotina (Kit LSAB + HRP, DAKO CYTOMATION, Carpinteria, CA, USA), utilizando os anticorpos primários anti-IL-17 e anti-ROR γ t (Quadro 1).

O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão e os cortes foram depois submetidos a todos os passos da técnica. Para o controle positivo foram usados cortes de tonsila submetidos aos mesmos passos imunoistoquímicos.

A técnica a ser utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);

⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);

⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Recuperação antigênica (Quadro 1);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Duas passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA). (Quadro 1);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário (*Biotinylated link universal*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com complexo estreptoavidina-HRP (*Streptavidin-HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
 - Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);

- Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);

⇒ Álcool etílico absoluto III (5 minutos);

⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);

⇒ Montagem em resina *Permout*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Especificidade	Nº do Catálogo	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
IL-17(H-132)	sc-7927	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Citrato pH 6,0, Pascal 121°C, 3 minutos	overnight
ROR γ t	ab78007	Abcam	1:800	Tris EDTA pH 6,0, Pascal 121°C, 3 minutos	overnight

Quadro 1. Especificidade, nº catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo.

4.6.1. ANÁLISE DO PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO

Após a realização da fase laboratorial, as lâminas de cada espécime foram analisadas sob microscopia de luz (Olympus CX41, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN) por um examinador previamente treinado, o qual durante a avaliação não teve acesso sobre qual tipo de lesão estava sendo analisada, conforme adaptado do estudo de Oh et al. (2011). Sob o aumento de 100x, foram selecionados 5 campos de maior imunoreatividade aos anticorpos anti-IL-17 e anti-ROR γ t, de acordo com metodologia adaptada de Peixoto et al. (2012). Sob o aumento de 400x, cada um desses campos foi fotomicrografado com o auxílio de uma câmara acoplada a um microscópio (Olympus EVOLT E-330, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN), as imagens

obtidas foram transferidas para um computador através do sistema Olympus Master™. Com o auxílio do programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (ImageJ®, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um desses 5 campos, foi realizada a contagem de todos os linfócitos imunopositivos presentes na interface tumor-hospedeiro, sendo considerados como imunomarcados no caso da IL-17, todas as células que exibirem coloração acastanhada, independente da intensidade, em região citoplasmática ou pericitoplasmática, e, no caso do ROR γ t, em região citoplasmática e nuclear, conforme metodologia adaptada de Zhang et al. (2010). Para cada caso foi estabelecida média de células imunopositivas para posterior comparação.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez realizada a coleta dos dados clínicos, histopatológicos e imunoistoquímicos os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA) na versão 17.0. Em relação à associação entre as características histomorfológicas e a localização do CCE, foi realizado o teste de *Qui-quadrado de Pearson*. Relativo à associação entre as características histomorfológicas e o estadiamento clínico, foi realizado o teste exato de *Fisher*. Os dados obtidos com a quantificação dos linfócitos imunomarcadas para a IL-17 e ROR γ t foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-Sminorv* para a avaliação da distribuição dos dados, onde se constatou ausência de distribuição normal. Desta forma, a comparação das medianas dos linfócitos imunopositivos para a IL-17 e ROR γ t entre as lesões de CCE de lábio e língua, aspectos histomorfológicos e estadiamento clínico foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para todos os testes estatísticos realizados no presente estudo, o nível de significância foi estabelecido em 5%, ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo foram incluídos 68 casos de CCE, sendo 40 de lábio inferior e 28 de língua. Os espécimes de língua foram obtidos dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os casos de lábio foram obtidos tanto deste serviço quanto da Unidade Campinense de Diagnóstico, Campina Grande/PB (Gráfico 1).

Baseado na análise descritiva dos dados clínicos, referentes aos pacientes portadores de CCE de lábio e língua, observou-se que, na amostra em questão, houve predominância do sexo masculino (n=40; 58,8%), com média de idade de 60,4 anos ($\pm 17,4$). A faixa etária mais acometida foi a 6ª década de vida, perfazendo 25% da amostra.

De acordo com a classificação clínica TNM, para os casos de CCEO de língua, a amostra foi assim distribuída: 5 (19,2%) casos foram classificados como estadiamento I, 5 (19,2%) casos como II, 7 (26,9%) casos como III e 9 (34,6%) casos como IV. Não foi possível a obtenção de dois dados dessa variável.

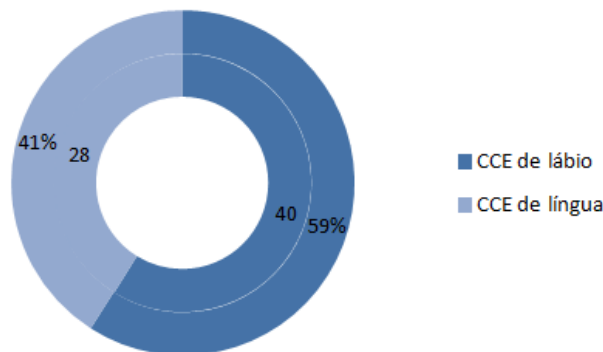


Gráfico 1: Distribuição da amostra quanto ao tipo de lesão. Natal-RN, 2014.

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Dos 68 casos de CCEO, 48 (70,6%) enquadraram-se no grupo de alto escore de malignidade e 20 (29,4%) no grupo de baixo escore de malignidade. A maioria dos casos de

lábio foi classificada como de baixo grau de malignidade 22 (55%), enquanto a maioria dos casos de língua foi classificada como de alto grau de malignidade 21 (75%) respectivamente.

O teste *Qui-Quadrado de Pearson* demonstrou haver associação estatisticamente significativa entre os casos de CCE de lábio e língua com a gradação histológica de malignidade ($p=0,024$) (TABELA 1). O teste *exato de Fisher* não mostrou haver associação entre o estadiamento clínico dos casos de CCE de língua e sua gradação histológica de malignidade ($p=0,644$) (TABELA 2).

Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade, segundo Bryne (1998) e localização do CCE. Natal – RN, 2014.

Localização do CCE	Gradação		Total n (%)	P
	Alto grau de malignidade	Baixo grau de malignidade		
	1. n (%)	2. n (%)		
Lábio	18 (45%)	22 (55%)	40 (100%)	0,024
Língua	21 (75%)	7 (25%)	28 (100%)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Tabela 2. Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade, segundo Bryne (1998) e o estadiamento clínico (TNM) para os casos de CCE de língua. Natal – RN, 2014.

Estadiamento clínico (TNM)	Gradação		Total n (%)	P
	Alto grau de malignidade	Baixo grau de malignidade		
	3. n (%)	4. n (%)		
Estágio I e II	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)	0,644
Estágio III e IV	13 (81,2%)	3 (18,8%)	16 (100%)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

5.3 RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

5.3.1 Análise da imunexpressão da IL-17

A marcação imunistoquímica para a IL-17 foi observada na região citoplasmática e pericitoplasmática de alguns linfócitos de todos os espécimes avaliados (FIGURAS 1A E 1B). Foi observada também marcação em outras células inflamatórias, como macrófagos. Células

endoteliais e epiteliais também exibiram imunopositividade na maioria dos espécimes de CCE avaliados.

A análise quantitativa da imunoposição da IL-17 revelou, para os casos de CCE em lábio inferior, uma contagem de linfócitos imunomarcados com valores médios variaram de 2 a 29 com uma média de 11,47 ($\pm 7,45$). Para aqueles casos localizados em língua, os valores médios variando de 1 a 30 com uma média de 8,67 ($\pm 8,34$). Antes da aplicação dos testes estatísticos foi realizado o teste de *Kolmogorov-Sminov* para verificar a distribuição da amostra e a mesma não exibiu distribuição normal. Dessa forma, as medianas foram empregadas, utilizando-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, o qual mostrou diferença estatisticamente significativa nas medianas de células imunopositivas para IL-17 entre os casos de CCE localizados em lábio e língua ($p=0,028$) (TABELA 3).

Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação à localização do CCE. Natal-RN, 2014.

Localização do COCE	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Lábio	40	9,00	6,00-16,50	38,90	1556,00	384,00	0,028
Língua	28	4,00	3,00-11,75	28,21	790,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

A análise quantitativa dos linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação à gradação histológica de malignidade, segundo Bryne (1998), revelou para as lesões de alto grau de malignidade ($n=39$) valores médios que variaram de 1 a 30, com uma média de 10,74 ($\pm 8,65$). Nas lesões de baixo grau de malignidade ($n=29$) as médias das contagens de linfócitos imunopositivos para a IL-17 variaram de 1 a 29, com uma média de 9,75 ($\pm 6,86$). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* não revelou diferença estatisticamente significativa. (TABELA 4).

Tabela 4. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para o número de linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação à gradação histológica de malignidade segundo Bryne (1998). Natal-RN, 2014.

Gradação histológica de malignidade	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Alto	39	8,00	3,00-18,00	34,46	1344,00	564,00	0,985
Baixo	29	7,00	5,00-12,50	34,55	1002,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Em relação ao estadiamento clínico das amostras de CCEs de língua, a análise quantitativa dos linfócitos imunopositivos para a IL-17 revelou, para as lesões com estadiamento I e II (n=10), valores médios que variaram de 1 a 30, com uma média de 8,90 ($\pm 9,74$). Nas lesões com estadiamento III e IV (n=16), os valores médios para os linfócitos imunopositivos variaram de 1 a 26, com uma média de 7,50 ($\pm 7,37$). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* não revelou diferença estatisticamente significativa (TABELA 5).

Tabela 5. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para o número de linfócitos imunopositivos para IL-17 em relação ao estadiamento clínico nos casos de CCEs em língua. Natal-RN, 2014.

Estadiamento clínico	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Estágio I e II	10	5,50	2,00-11,75	13,90	139,00	76,00	0,832
Estágio III e IV	16	4,00	3,00-10,75	13,25	212,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

5.3.2 Análise da imunoexpressão do ROR γ t

A marcação imunoistoquímica para o ROR γ t foi observada em região nuclear e citoplasmática de alguns linfócitos de todos os espécimes avaliados (FIGURAS 2A e 2B). Células endoteliais e epiteliais também exibiram imunopositividade na maioria dos espécimes de CCE avaliados.

A análise quantitativa da imunoposição do ROR γ t revelou, para os casos de CCE em lábio, uma contagem de linfócitos positivamente marcados com valores médios variando de 1 a 13 com uma média de 3,65 (\pm 2,58). Dentre os casos localizados em língua, os valores médios variaram de 0 a 16 com uma média de 3,82 (\pm 3,26). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* não mostrou diferença estatisticamente significativa nas medianas de células imunopositivas para o ROR γ t entre os casos de CCE localizados em lábio e língua ($p=0,915$) (TABELA 6).

Tabela 6. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação a localização do CCE. Natal-RN, 2014.

Localização do COCE	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Lábio	40	3,00	2,00-4,75	34,71	1388,50	551,50	0,915
Língua	28	3,00	1,25-6,00	34,20	957,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

A análise quantitativa dos linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação à gradação histológica de malignidade, segundo Bryne (1998), revelou para as lesões de alto grau de malignidade ($n=39$) valores médios que variaram de 1 a 16, com uma média de 4,10 (\pm 3,08). Nas lesões de baixo grau de malignidade ($n=29$) as médias das contagens de linfócitos imunopositivos para o ROR γ t variaram de 0 a 11, com uma média de 3,20 (\pm 2,49). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* não revelou diferença estatisticamente significativa (TABELA 7).

Tabela 7. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (p) para o número de linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação à gradação histológica de malignidade segundo Bryne (1998). Natal-RN, 2014.

Gradação histológica de malignidade	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Alto	39	3,00	2,00-5,00	37,47	1461,50	449,50	0,145
Baixo	29	3,00	1,00-4,50	30,50	884,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Em relação ao estadiamento clínico das amostras de CCEs de língua, a análise quantitativa dos linfócitos imunopositivos para o ROR γ t revelou, para as lesões com estadiamento I e II (n=10), valores médios que variaram de 0 a 16, com uma média de 4,30 ($\pm 4,69$). Nas lesões com estadiamento III e IV (n=16), os valores médios para os linfócitos imunopositivos variaram de 1 a 8, com uma média de 3,43 ($\pm 2,30$). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* não revelou diferença estatisticamente significativa (TABELA 8).

Tabela 8. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para o número de linfócitos imunopositivos para ROR γ t em relação ao estadiamento clínico nos casos de CCEs em língua. Natal-RN, 2014.

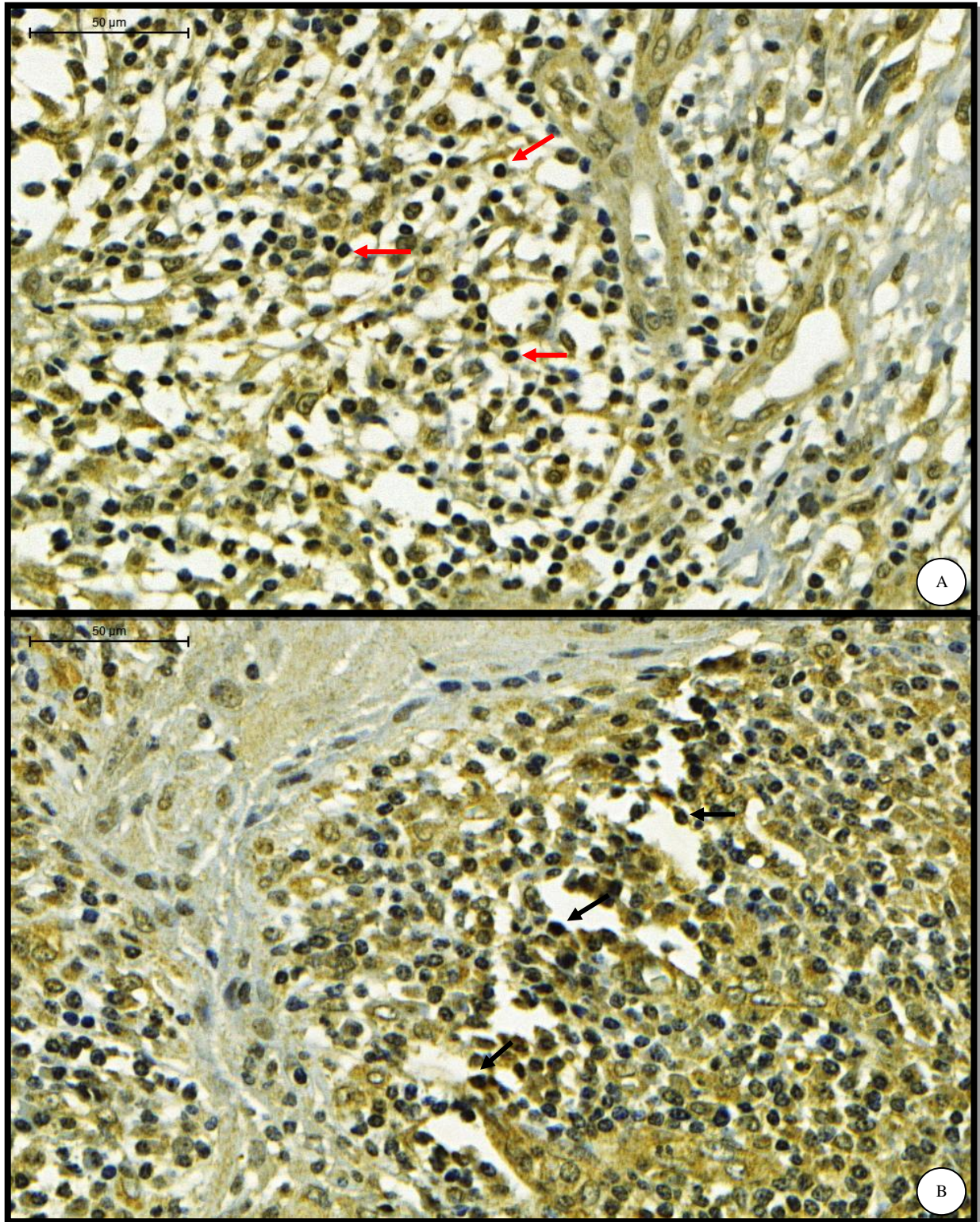
Estadiamento clínico	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Estadiamento I e II	10	3,00	1,00-6,25	13,45	134,50	79,50	0,979
Estadiamento III e IV	16	3,00	1,25-5,75	13,53	216,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

5.3.3 Correlação da imunexpressão da IL-17 com o ROR γ t

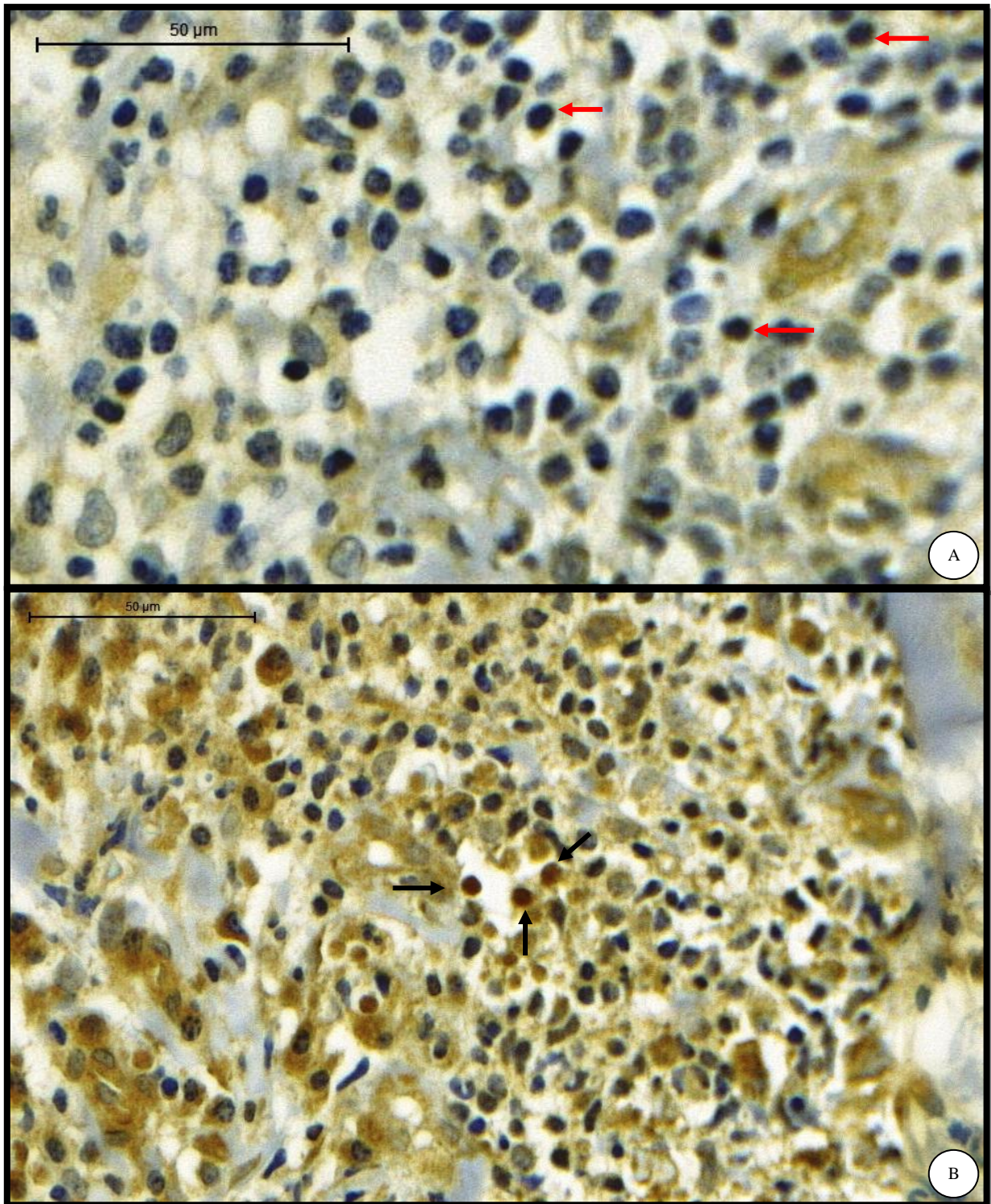
Foram analisadas ainda possíveis correlações entre as imunexpressões da IL-17 e do ROR γ t. Nas lesões de CCEs de lábio e língua, o teste de correlação de *Spearman* demonstrou não haver correlação estatisticamente significativa entre as marcações de IL-17 e ROR γ t ($r = 0,181$; $p = 0,140$). Resultado similar foi obtido após análise isolada dos casos de CCEs de lábio ($r = -0,049$; $p = 0,764$). Para os casos de CCEs de língua foi constatada uma correlação positiva fraca entre os imunomarcadores estudados com uma correlação estatisticamente significativa ($r = 0,455$; $p = 0,015$).

Figuras 1A e 1B: Fotomicrografia demonstrando o padrão de imunexpressão da IL-17 em região pericitoplasmática (setas pretas) e citoplasmática (setas vermelhas) em lábio (A) e em língua (B) - Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH® Kft. 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary, H-1121).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Figuras 2A e 2B: Fotomicrografia demonstrando o padrão de imunexpressão do ROR γ t em região citoplasmática (setas vermelhas) e nuclear/citoplasmática (setas pretas) em lábio (A) e em língua (B) - Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH® Kft. 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary, H-1121).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

6. DISCUSSÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo (INCA, 2014). O CCE é uma neoplasia maligna de origem no epitélio escamoso que corresponde a mais de 90% dos cânceres da cavidade oral e orofaringe (LAMBERT et al., 2011). Os principais sítios de acometimento são borda da língua e assoalho de boca (SANTOS et al., 2010; PATEL et al., 2011; POESCHL et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; FRONIE et al., 2013; PANZARELLA et al., 2013). Os CCEs que envolvem o vermelhão labial representam 25% de todos os tumores da cavidade oral, sendo o lábio inferior o sítio mais acometido (ANTUNES; ANTUNES, 2004; SOUZA et al., 2011). Esse tipo de lesão labial possui curso clínico de baixa agressividade, prognóstico favorável e progride lentamente (VIEIRA et al., 2012). O CCE de língua é o câncer da cavidade oral mais relacionado com metástases para linfonodos, pois histologicamente possui rica rede linfática além de muitos feixes de fibras musculares. Essas características tornam a língua um local mais susceptível a invasão local e metástases do câncer (LIM, 2006; SANO, MYERS, 2007).

Neste estudo, evidenciou-se discreta predileção do CCE pelo sexo masculino, sendo este acometido em 58,8% dos casos, com maior prevalência na idade média de 60,4 anos de idade. Achados semelhantes são descritos em outras pesquisas (SANTOS; BATISTA; CANGUSSU, 2010; JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; PATEL et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; FRONIE et al., 2013). Para Fronie et al. (2013) a idade aumenta o risco de desenvolvimento de câncer oral devido a soma de efeitos nocivos de agentes carcinógenos. Quanto ao sexo, a maior ocorrência de câncer em indivíduos pode estar associado ao maior contato com os fatores de risco mais importantes, como o grande consumo de álcool e tabaco para o câncer intraoral e radiação ultravioleta para o câncer de lábio, naqueles que exercem suas atividades laborais ao sol (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011). Porém, de acordo com Pires et al. (2013) as mudanças nas atividades sociais e de estilo de vida da mulher na atualidade estão tornando-as mais expostas a agentes carcinogênicos, o que tem aumentado a frequência de câncer nessas pacientes.

No presente estudo, os CCEs de lábio foram significativamente associados com gradação histopatológica de baixo grau de malignidade e os de língua com alto grau. De forma geral, é reconhecido que o prognóstico dos pacientes com CCEs nesta localização é bom, apresentando boas taxas de sobrevida em cinco anos, com índices que variam de 80 a

90%, desde que a doença seja diagnosticada em estágios precoces (SARGERAN et al., 2009; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012). Já os CCEs localizados em língua exibem alto potencial de invasão, além de alta probabilidade de desenvolver metástase linfonodal regional (OKADA et al., 2003). No entanto, outros estudos não encontraram associação entre a gradação histológica de Bryne no “front” tumoral em CCE de língua com parâmetros clínicos como: estadiamento clínico, metástase linfonodal, desfecho da doença ou tempo de sobre vida (SILVEIRA et al., 2007; LINDENBLATT et al., 2012).

Esta pesquisa demonstrou que a maioria das lesões em língua encontrava-se em estágio III e IV (61,5%), ou seja, estágio considerado avançado. Apesar do fácil acesso à via oral para exame e do câncer oral ser quase sempre precedido por mudanças da mucosa inicialmente visíveis e sintomáticas (tais como eritroplasia e leucoplasia), o diagnóstico em estágio avançado é um achado comum (SANTOS; BATISTA; CANGUSSU, 2010; FRONIE et al., 2013; PANZARELLA et al., 2013). Como em outros cânceres, o atraso na procura por tratamento é responsável por 60% de todos os diagnósticos tardios (SCOTT; MCGURCK; GRUNFELD, 2007). Cerca de 30% dos pacientes com CCEO geralmente esperam mais de três meses para procurar um profissional da saúde depois de descobrir os sinais e sintomas da doença (SCOTT; MCGURCK; GRUNFELD, 2007; PANZARELLA et al., 2013). Um dos fatores responsáveis por isto é a falta de conhecimento do paciente em relação aos sinais do câncer, confundindo-o com sinais iniciais de outras doenças da cavidade oral, como trauma, processo infeccioso ou transtornos causados por dentaduras (PANZARELLA et al., 2013). Outro fator é a não realização do exame de rotina da mucosa oral durante as consultas odontológicas. De acordo com Panzarella et al. (2013) quase todos os pacientes que foram diagnosticados com CCEO avançado relataram pobre prática da inspeção da cavidade oral por médicos ou dentistas. O cirurgião-dentista é responsável pela prevenção primária do câncer oral, devendo realizar o exame de rotina da cavidade oral, encorajar o paciente a cessar o hábito de fumar, diminuir a ingestão de álcool e usar protetor solar (SEONE-ROMERO et al., 2012). A dificuldade de acesso e/ou qualidade dos serviços de saúde também refletem diretamente no diagnóstico tardio do câncer oral (SANTOS; BATISTA; CANGUSSU, 2010).

Nessa pesquisa, o SGHM proposto por Bryne (1998) não mostrou correlação estatisticamente significativa com o estadiamento clínico das lesões em língua, apesar da maioria das lesões em estágio III e IV estarem classificadas como de alto grau de malignidade (81%). Na literatura, os resultados ainda são conflitantes em relação a utilização de fatores clínicos e histomorfológicos como indicadores de prognóstico e comportamento biológico de carcinomas epidermóides orais. Resultados semelhantes ao dessa pesquisa foram vistos em

outros estudos (SPIRO et al., 1999; LIM et al., 2004; SILVEIRA, 2004; KUROKAWA et al., 2006). Diferentemente, outros estudos mostram que este sistema aliado ao TNM poderia prever o curso clínico de neoplasias malignas da cavidade oral, permitindo, assim, decidir o melhor tratamento para cada paciente (SAWAIR et al., 2003; LINDENBLATT et al., 2012). Dessa forma, muitos estudos têm buscado outros parâmetros indicadores de agressividade e comportamento dos CCEOs (HOGMO et al., 1999; SILVEIRA et al., 2004; PIVA et al., 2013). Neste contexto, segundo alguns autores, a imunidade local em CCEO pode contribuir para o desenvolvimento de novos marcadores moleculares, que ajudarão a identificar o estado imunológico do paciente, prever a progressão da doença e selecionar o tratamento apropriado individualizado (SHPITZER et al., 2009; SILVEIRA et al., 2010).

A natureza da resposta imune pode determinar efeitos benéficos ou maléficos na patologia tumoral (ZOU; RESTIFO, 2010; DE COSTA et al., 2012). Assim, conhecer os tipos celulares que estão presentes no infiltrado inflamatório de diversos tipos de câncer é fundamental, pois algumas células e moléculas inflamatórias têm um crucial papel na inicialização e manutenção da imunidade antitumoral (ZOU; RESTIFO, 2010; SENOVILLA et al., 2012). As células Th17 se caracterizam pela presença do fator de transcrição ROR γ t e secreção da citocina pró-inflamatória IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (IVANOV et al., 2006; ZOU; RESTIFO, 2010). Estas células exercem importante papel na patogênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias, porém sua prevalência no infiltrado inflamatório tumoral e sua função na imunidade tumoral permanecem largamente desconhecidas (SU et al., 2010; NUÑEZ et al., 2012; WANG et al., 2012; QI; HUANG; WANG, 2013). Estudos mostram que essas células podem estar envolvidas na patogênese e na progressão tumoral do câncer (TARTOUR et al., 1999; STEINER et al., 2003; NUMASAKI et al., 2005; LE GOUVELLO et al., 2008; MIYAHARA et al., 2008; SFANOS et al., 2008; ZHU et al., 2008; HE et al., 2010; HE et al., 2011; ZHANG et al., 2010; CHEN et al., 2010; WU et al., 2012; SHEN et al., 2012; YAMADA, SAITO; IKEGUSHI et al., 2012; SU et al., 2014). Em contrapartida, outras pesquisas verificam que essas células podem promover a rejeição tumoral através do sistema imune (HIRAHARA et al., 2000; HIRAHARA et al., 2001; BENCHETRIT et al., 2002; KENNEDY et al., 2011; YANG et al., 2012; TONG et al., 2012; HUS et al., 2014).

A falta de marcadores de superfície específicos para as células Th17 causa problemas no seu isolamento, tornando difícil sua análise funcional direta *ex vivo* (ZHAO et al., 2012). Para Chugh et al (2013) o envolvimento das células Th17 com o câncer pode ser avaliado através da expressão de suas citocina chave (IL-17) e de seu fator de transcrição (ROR γ t). Seguindo essa linha de pesquisa, o presente trabalho avaliou a imunexpressão da IL-17 e

ROR γ t, característicos das células Th17, presentes no infiltrado inflamatório peritumoral em amostras de CCE de lábio e língua. Na literatura indexada pesquisada não há registros de pesquisas correlacionando imuno-histoquimicamente esses dois marcadores com o CCE de lábio e língua, o que torna esse trabalho inédito.

Em relação a IL-17 e ROR γ t foi possível observar que houve positividade para todos os espécimes analisados. Estudos recentes e esta pesquisa comprovam que as células Th17 estão presentes de forma significativa no microambiente tumoral tanto de CCE orais e de cabeça e pescoço (KESSELRING et al., 2010, KESSELRING et al., 2011, LEE et al., 2011; LI et al., 2011; DE COSTA et al., 2012; GAUR et al., 2012) quanto de diversas outras localizações, como ovário (MIYAHARA et al., 2008; KRYCZEK et al., 2009a), pulmão (NUMASAKI et al., 2005; CHEN et al., 2010), próstata (STEINER et al., 2003; SFANOS et al., 2008), mama (ZHU et al., 2008; YANG et al., 2012), endometrial (ZHANG et al., 2014); fígado (ZHANG et al., 2009), esôfago (CHEN et al., 2012), sistema linfático (SHEN et al., 2012); colorretal (GOUVELLO et al., 2008; WANG et al., 2012); cérebro (PALADUGU et al., 2013) e estômago (SU et al., 2014), mostrando que esse perfil celular está envolvido na imunidade tumoral.

Os resultados do presente estudo mostraram que outras células além dos linfócitos T, apresentavam imunomarcagem positiva para a IL-17 como macrófagos, células endoteliais e epiteliais. Outros estudos também verificaram que a IL-17, juntamente com outros membros de sua família (IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F), pode ser secretada por várias células do sistema imunológico inato e adaptativo (WEAVER, et al., 2007; KIM; JORDAN, 2013). Apesar das células Th17 serem a fonte mais característica da IL-17A, outras células também a produzem, como o TCD8+, T γ δ , células NK, macrófagos, neutrófilos e células indutoras do tecido linfóide, células endoteliais, ceratinócitos e fibroblastos (WEAVER, et al., 2007; DAMSKER; HANSEN; CASPI, 2010).

Uma vez que linfócitos imunomarcados para IL-17 podem ser definidos como células Th17 (YANG et al., 2012), esta pesquisa observou que a quantidade destas células estava maior nos casos de CCE de lábio quando comparado aos de língua, demonstrando também haver correlação estatisticamente significativa entre essas variáveis ($p = 0,028$). Neste caso, sugere-se que este achado possivelmente reflete o papel antitumoral das células Th17 nas amostras de CCE de lábio, uma vez que este, segundo dados da literatura, é menos agressivo e tem melhor prognóstico, quando comparado ao CCE de língua (VARTANIAN et al., 2004; LIM, 2006; CHOI et al., 2006). Esses dados são consistentes com várias linhas de evidência do papel antitumoral das células Th17 tanto em modelo animal quanto em humanos (BONI et

al., 2008; MURANSKI et al., 2008; KRYCZEK et al., 2009b, GNERLICH et al., 2010; YE et al., 2010; KESSELRING et al., 2010; GAUR et al., 2012; SHEN et al., 2012; WANG et al., 2012; YANG et al., 2012; HUS et al., 2014). Diante desse fato, destaca-se a necessidade de entender como as células Th17 medeiam a imunidade antitumoral em pacientes com câncer, visto que não expressam moléculas de perforinas e granzimas B e não possuem efeitos diretos na proliferação e apoptose das células cancerígenas de tumores primários, não possuindo, portanto, ação citotóxica direta contra as células tumorais (YEN et al., 2009; KRYCZEK et al., 2009a, ZOU; RESTIFO, 2010).

Alguns autores relatam que as células Th17 podem mediar a atividade antitumoral de forma indireta através do recrutamento de células efetoras do sistema imune e retenção destas dentro do microambiente tumoral (SATO ET AL., 2005; GALON et al., 2006; ZOU; ROSTIFE, 2010; GAUR et al., 2012). Dessa forma, em uma destas vias, a IL-17, derivada da célula Th17 atua sinergicamente com o IFN- γ , induzindo a produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 por células malignas e macrófagos, o que leva ao tráfico de células que conhecidamente desempenham ações antitumorais, como Th1, TCD8⁺ e NK para o microambiente tumoral (KRYCZEK et al., 2009a; ZOU; ROSTIFE, 2010). Além disso, a capacidade citotóxica das células NK é aumentada pela presença da IL-17A, visto que esta citocina aumenta a expressão de moléculas citotóxicas como TNF- α , INF- γ , perforinas e granzimas B e receptores de ativação de células NK (NKp46, NKp44, NTB-A e NKG2D) (LU et al., 2013).

Outra forma de ação antitumoral indireta das células Th17 é através do acúmulo de células dendríticas mieloides no microambiente tumoral. As células Th17 também induzem a secreção da quimiocina CCL20 pelas células tumorais, o que promove o tráfico de APCs mielóides para o microambiente tumoral. Isso permite uma melhor apresentação de antígenos tumorais e, conseqüentemente, uma forte resposta de células T, já que as células TCD8⁺ são efetivamente ativadas por células dendríticas (MARTIN-OROZCO et al., 2009; GNERLICH et al., 2010; ZOU; ROSTIFE et al., 2010).

Outra forma de ação da IL-17 na atividade antitumoral é através da supressão das células Treg, que são responsáveis por suprimir a resposta imune aos tumores (ZOU; RESTIFO et al., 2010; HUS et al., 2014). Gaur et al. (2012) ao estudar o balanço entre as células Th17 (CD4⁺IL-17⁺) e Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) em CCEO, encontraram um equilíbrio direcionado para o fenótipo de células Th17 nos estágios iniciais da doença. Os autores acreditam que, no estágio inicial do tumor, a presença de IL-6 (citocina secretada pelas células Th17 e que possui potencial para inibir o Foxp3) juntamente com o TGF- β

promova um direcionamento para Th17 através de um mecanismo de *feed-back* positivo, proporcionando a sub-regulação de Treg. Os autores sugerem que estratégias terapêuticas que aumentem as células Th17 e suprimam as células Treg no tumor podem ser benéficas em potencializar a atividade antitumoral em pacientes com câncer. Sabendo do efeito pró-tumoral das células Treg, Gnerlich et al. (2010) induziu o fenótipo de células Th17 em células pancreáticas murinas (Pan02) que secretam TGF- β através da transfecção dessas células com o gene que codifica a IL-6. Em seguida essas células tumorais foram injetadas subcutaneamente em ratos (C57BL/6). Estudos imunistoquímicos demonstraram aumento da Th17 (fenótipo CD4⁺IL-23⁺ e CD4⁺IL-17⁺) no infiltrado inflamatório tumoral, além de menor crescimento do tumor e melhor sobrevida mediana global. Esses achados sugerem que a indução de células Th17 endógenas e alteração no balanço Treg/Th17 no microambiente do tumor produz um efeito antitumoral. De forma semelhante, os achados da presente pesquisa nos leva a supor que as células Th17 exercem um papel antitumoral em CCE de lábio, o que explicaria o melhor curso clínico dessa lesão.

Há evidências que células Th17 se sobrepõem a células Th1 gerando o fenótipo Th17 semelhante a Th1 (CHEN; SHANNON, 2013). Annunziato et al. (2013) em estudo com distúrbios inflamatórios humanos, relatou que, devido a vários mecanismos imunoregulatórios, as células Th17 possuem grande transitoriedade fenotípica, visto que elas podem mudar rapidamente para o perfil Th17 semelhante a Th1. Apesar dessa hipótese ser descrita para distúrbios inflamatórios, é possível sugerir que o componente inflamatório associado ao tumor também passa por eventos semelhantes, o que, desta forma, justificaria a presença desse fenótipo em diversos cânceres humanos, como de ovário, cólon, pâncreas, renal, hepatocelular e melanoma (KRYCZEK et al., 2009a), pulmão (YE et al., 2010), gástrico (CHEN et al., 2011) e próstata (SFANOS et al 2008). As células Th17 semelhantes a Th1 expressam tanto IL-17 quanto INF- γ e fenótipos como IL-17⁺INF- γ ⁺, CD161⁺IL-17⁺INF- γ ⁺, ROR γ t⁺Tbet⁺, Tbet⁺IL-17⁺INF- γ ⁺ tem sido relatados (HARRINGTON et al., 2011; ANNUNZIATO et al., 2013; CHEN; SHANNON, 2013). A razão para a mudança fenotípica não é clara, mas sabe-se que ela ocorre na presença de citocinas IL-2 e TNF- α . (MURANSKI et al., 2011; ANNUNZIATO et al., 2013). Esse perfil celular tem mostrado impacto positivo na imunidade antitumoral em diversos estudos. Pesquisa realizada por Muranski et al. (2008) desenvolveu um novo MHC de classe II e TCR em um modelo murino transgênico no qual as células TCD4 reconheciam um novo epítipo (TRP1) que é um antígeno expresso por melanócitos normais e pelo melanoma murino B16. As células foram cultivadas em diferentes condições para polarizar para linhagens Th1, Th17 ou Th0. Foi realizado transferência adotiva

de células T com essas três populações celulares. Apenas as células Th17 semelhantes a Th1 mediavam significativa resposta antitumoral, sendo esse efeito maior do que o encontrado naqueles animais que receberam somente o fenótipo Th1. A neutralização das interleucinas IL-17 e IL-23, *in vivo*, não tinham efeitos significativos na capacidade das células Th17 a rejeitar tumores, porém a rejeição tumoral foi completamente inibida quando houve a neutralização do INF- γ (MURANSKI et al., 2008). Isso fortemente sugere que as células Th17 são polifuncionais e podem representar um componente crítico para a resposta antitumoral de longo prazo (NUÑEZ et al., 2012). Conseqüentemente, a expressão preferencial de células CD4, *in vitro*, sob condições que polarizem para Th17 e sua subsequente transferência adotiva pode ser uma terapia efetiva contra o câncer (MIDDLETON; ANNELS; PANDHA, 2012).

Em contrapartida, existe uma gama de pesquisas que associam a produção da IL-17 com a progressão tumoral, particularmente através do processo de auxílio à angiogênese mas falham em conclusivamente demonstrar que a IL-17 está sendo produzida somente ou principalmente por células Th17 (MIDDLETON; ANNELS; PANDHA, 2012). Em câncer colorretal a alta expressão da IL-17 está associada positivamente com a microdensidade vascular e essa citocina é considerada, portanto, um fator prognóstico independente de pior sobrevida global. Entretanto, a fonte de IL-17 e as correlações foram feitas com níveis imunistoquímicos dessa citocina e não com densidade de células Th17 (LIU et al., 2011). Estudo em câncer de mama mostra que a IL-17, através de MMPs, estava associada a uma maior invasão tumoral, porém, nestes casos, mais de 98% das células que secretavam IL-17 eram macrófagos, havendo pouca evidência da expressão de IL-17 por células T (ZHU et al., 2008). Dessa forma, sugere-se que a atividade biológica da IL-17 não deve ser considerada como sinônimo da ação das células Th17, como demonstrado por alguns autores (MIDDLETON; ANNELS; PANDHA, 2012; NUÑEZ et al., 2012). Além disso, o fenótipo das células Th17 (semelhantes a Th1 ou a Treg) é temporal e dinâmico bem como dependente da localização tumoral e do microambiente local (ZOU; RESTIFO, 2010; MIDDLETON; ANNELS; PANDHA, 2012; SUNDRUD; TRIVIGNO, 2013).

Os efeitos pró-tumorais da IL-17 mostram-se também em pesquisas que fazem uso de sua forma exógena (transfectada ou inoculada) e não endógena (IL-17 derivada das células do hospedeiro) não havendo, portanto, uma ligação direta com as células Th17 e suas formas fenotípicas. A atividade biológica da IL-17 endógena pode ser diferente da exógena devido a diferenças nas concentrações locais, biodisponibilidade e alvos potenciais (ZOU et al., 2010) Estudos relatam que, em ratos, a IL-17 exógena possibilitou rápido crescimento tumoral,

maior densidade vascular *in vivo* e inibição da infiltração de células TCD8⁺ (NUMASAKI et al., 2003; NUMASAKI et al., 2005; HE et al., 2010). Portanto, deve-se levar em conta que o efeito líquido da presença da IL-17 será dependente do contexto da sua produção e de suas interações com o microambiente tumoral (ZOU et al., 2010; MIDDLETON; ANNELS; PANDHA, 2012).

A imunexpressão da IL-17 não obteve correlação estatisticamente significativa com nenhum dos parâmetros clínicos e morfológicos desse estudo. Entretanto, verificamos que sua presença era levemente maior naqueles tumores de língua com estadiamento clínico I e II quando comparado com aqueles em estadiamento III e IV. Dessa forma torna-se possível sugerir que isso talvez reflita o papel protetor das células Th17 em lesões de estágio inicial e que são, portanto, menos agressivas. Resultado semelhante foi relatado em estudo de Yang et al. (2012) com câncer de mama onde as células Th17 estavam positivamente correlacionadas com o estadiamento clínico TNM, estando mais presente no estágio tumoral I e II. Estudo de Wang et al. (2012) demonstrou que as células Th17 estavam aumentadas em pacientes portadores de câncer de cólon, porém estava associada com os estágios iniciais da doença, pois sua quantidade tornava-se cada vez menor com a evolução do câncer. Semelhantemente ao nosso estudo, pesquisas também não encontraram uma correlação positiva entre a presença de células Th17 e diversos sistemas de gradação histológica de malignidade (YAMADA; SAITO; IKEGUCHI, 2012; YANG et al., 2012; WU et al., 2012).

As diversas linhagens de linfócitos são caracterizadas pelas citocinas específicas que são produzidas, por suas funções imunoregulatórias e pelos seus fatores de transcrição, os quais podem determinar características fenotípicas ou genotípicas para cada linhagem (WEAVER et al., 2007). O ROR γ t é o fator de transcrição envolvido na diferenciação das células Th17 efectoras e são suficientes para a secreção de citocinas-chaves dessas células, como IL-17A, IL-17F e IL-22 (CHEN; SHANNON, 2013). No entanto, no presente estudo, outras células, além de linfócitos, apresentaram imunomarcagem para o ROR γ t. Esse é um achado comum na literatura, já que alguns estudos mostram que esse marcador pode ser expresso também por timócitos em desenvolvimento, células indutoras do tecido linfóide, células T $\gamma\delta$ IL-17⁺ e células NKT IL-17⁺ (WEAVER et al., 2007; KIM; JORDAN, 2013).

Dados dessa pesquisa mostram que não houve correlação estatisticamente significativa entre a imunexpressão do ROR γ t nos casos de CCE de lábio e língua ($p = 0,979$). Vários estudos mostram que o ROR γ t mostra-se expresso tanto em pacientes saudáveis quanto naqueles acometidos pelo câncer, porém mostram-se mais presentes nos indivíduos acometidos pela doença. Estudos em pacientes com câncer gástrico demonstraram haver

maiores frequências de células Th17 (através de suas citocinas e fator de transcrição característicos, como IL-17, IL-23p19 e ROR γ t) quando comparado ao controle saudável (ZHANG et al., 2008; SU et al., 2014). O aumento da prevalência de células Th17 no infiltrado inflamatório tumoral pode contribuir para a patogênese do câncer gástrico (ZHANG et al., 2008) e para o desenvolvimento de metástases (SU et al. 2014). Hu et al. (2011) em estudo com glioma verificaram mais altos níveis séricos de IL-17 e ROR γ t em pacientes com câncer, quando comparado ao grupo controle (pacientes com trauma cerebral). Os autores afirmam que as células Th17 podem exercer um papel importante na tumorigênese do glioma e na sua progressão. Chugh et al. (2013) em pesquisa com câncer de bexiga detectou maiores níveis séricos de citocinas relacionadas às células Th17 (IL-17 e ROR γ t) nos pacientes acometidos pela doença, quando comparados aos controles saudáveis. Tal achado mostra o possível envolvimento das células Th17 com o carcinoma de bexiga.

Achados diferentes foram demonstrados por Zhao et al (2013), onde os níveis séricos e proteicos de células Th17 estavam diminuídos em pacientes com carcinoma de pulmão quando comparado a pacientes saudáveis. Os autores, portanto, acreditam no papel protetor das células Th17 e afirmam que os baixos níveis dessas células nesses pacientes poderão contribuir para a promoção do crescimento tumoral e metástases a distância. Semelhantemente, pesquisa realizada por Kennedy et al. (2011) demonstrou maiores quantidades de IL17 e ROR γ t em biópsias de pacientes com gastrite infectados pelo *H. pylori*, quando comparado àqueles com câncer gástrico. Os autores sugerem que o aumento da expressão de fatores relacionados a Th17 não possui correlação com a patogênese molecular da tumorigênese gástrica.

A falta de diferença estatística entre ROR γ t e os grupos estudados detectados em nosso estudo pode ser explicada pela grande plasticidade das células Th17. O perfil celular predominante no câncer é o de células Treg, tanto sistemicamente quanto no microambiente tumoral (KRYCZEK et al., 2009a, ZOU; RESTIFO, 2010; BENEVIDES et al., 2013; AMEDEI et al., 2012). A sua maior quantidade se dá pelo recrutamento dessas células pelo tumor, caracterizando um mecanismo de escape imunológico, uma vez que suprimem a proliferação de células T, a apresentação de antígenos e a produção de citocinas (GNERLICH et al., 2010; AMEDEI et al., 2012; CHEN et al., 2012). Existe uma forte correlação entre a expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e Foxp3, devido a uma extensa regulação recíproca desses fatores por diversas citocinas (JETTEN et al., 2009; CHEN; SHANNON et al., 2013). Conseqüentemente, células Th17 denotam uma plasticidade recíproca com células Treg não sendo possível determinar se os fenótipos ROR γ t⁺Foxp3⁺, Foxp3⁺IL-17⁺,

ROR γ t⁺Foxp3⁺IL17⁺ advêm de células Treg ou Th17 (VOO et al., 2009; ZOU; RESTIFO, 2010; CHU et al., 2011; LI; BOUSSIOTIS, 2013; YE; LIVERGOOD; PENG, 2013). Aliado a isso, as células Th17 têm grandes propensões a mudanças fenotípicas de acordo com o perfil de citocinas presentes no microambiente tumoral. Assim, como o microambiente tumoral varia dependendo do tipo, localização e estágio do câncer, espera-se que a função dessas células também mude de acordo com essas condições (ALIZADEH; KATSANIS; LARMONIER, 2014). Além disso, podem ocorrer variações fenotípicas de forma espacial e temporal dentro do mesmo tumor (MIDDLETON; ANNELS; PANDHA, 2012).

Em determinado contexto inflamatório tumoral, como, por exemplo, na presença de TGF- β e citocinas inflamatórias como IL-6, IL-21 ou IL-23 as células Treg passam a expressar ROR γ t e secretar IL-17 (CHEN; SHANNON et al., 2013; LI; BOUSSIOTIS, 2013), possuindo, portanto atividades imunossupressoras (ZOU; RESTIFO, 2010). Pesquisas mostram que a presença do TGF- β é um achado comum em CCEO (PRIME et al., 2004; WANG et al., 2009; PIVA et al., 2013), estando relacionado com processos de progressão tumoral (QUAN et al., 2013; PIVA et al., 2013). Com base nesses achados, pode-se supor que a grande quantidade de TGF- β no microambiente tumoral de CCEO pode levar a diferenciação das células Th17 em Treg, o que nos limita em afirmar tanto que as células ROR γ t⁺ quanto IL-17⁺ desse estudo sejam puramente células Th17.

O efeito pró-tumoral do fenótipo Th17 semelhante a Treg é mostrado em diversas pesquisas. Em câncer de cólon, células ROR γ t⁺Foxp3⁺IL-17⁺ são um componente etiológico da polipose, estão associadas com o câncer em estágios avançados e são capazes de aumentar a resposta inflamatória e diminuir a imunidade mediada por célula T citotóxicas através da redução de sua presença no microambiente tumoral (BLATNER et al., 2012; BLATNER; GOUNARI; KHAZAIE, 2013; LI; BOUSSIOTIS, 2013). Pesquisa em câncer de mama demonstrou através da expressão de Foxp3, IL-17-A e ROR γ t que as células Th17 e Treg estão sincronicamente aumentadas e que as mesmas estavam associada com a agressividade tumoral (BENEVIDES et al., 2013). Em estudos realizados com câncer de cólon, as células Treg de fenótipo ROR γ t⁺Foxp3⁺ estiveram relacionadas com estágios mais avançados da doença, enquanto que a ablação do ROR γ t das células Treg pró-inflamatórias restaurou a capacidade anti-inflamatória das células Treg, protegeu contra a polipose e aumentou a imunidade antitumoral, através do aumento sérico de IFN- γ , IL-12 e IL-27, que promovem a diminuição do VEGF e o aumento de moléculas que promovem maior resposta antitumoral e lise tecidual (BLATNER et al., 2012). Dessa forma, há uma esperança que a inibição farmacológica do ROR γ t poderá promover benefícios clínicos aos pacientes com câncer de

cólon (BLATNER et al., 2012; BLATNER; GOUNARI; KHAZAIE, 2013). No entanto, alguns autores sugerem que os efeitos diretos desta inibição sobre a inflamação devem ser realizados com cautela, uma vez que determinadas respostas inflamatórias, como maiores índices de IL-17, podem exercer ação protetora na progressão da lesão benigna para o câncer invasivo (BLATNER et al., 2012).

Especificamente para o presente estudo, não foi possível correlacionar os parâmetros como o estadiamento clínico TNM e gradação histológica das lesões estudadas com a expressão de ROR γ t. Semelhantemente, estudo realizado por Hu et al (2013) em pacientes com glioma também não encontrou correlação estatisticamente significativa entre os níveis protéicos da IL-17 e ROR γ t com o estágio clínico do tumor. No entanto, o estudo de Zhao et al. (2013), em câncer de pulmão, verificou que a proporção de células Th17/Treg (isto é, ROR γ t/Foxp3) tinha correlação negativa com o estadiamento TNM, ou seja quanto maiores as quantidade de células Th17, menores eram os estadiamentos clínicos. Assim, os autores sugeriram que o equilíbrio entre as duas linhagens poderia modular a imunidade antitumoral. De forma contrária, estudo de Wang et al. (2010), em pacientes com câncer de fígado, detectou que níveis séricos de Th17 (caracterizada pela presença de IL-17, IL-23p19 e ROR γ t) aumentavam de forma proporcional ao avanço do estadiamento clínico TNM, indicando que as células Th17, através de suas citocinas, podem participar, de forma direta ou indireta, promovendo a invasão e a progressão do carcinoma hepatocelular. Da mesma forma Zhang et al. (2008) em estudo com pacientes portadores de câncer de pulmão, encontraram que as células Th17 estavam associadas a um maior estágio clínico da doença. Esses resultados diversos nos permite sugerir que a plasticidade e equilíbrio das células Th17 com as células Treg e a etiopatogenia de cada lesão determinará o efeito pró-tumoral ou antitumoral das células Th17.

O teste de correlação de Spearman demonstrou que nos casos de lábio houve uma correlação negativa fraca entre o ROR γ t e a IL-17. Nos casos de língua, o teste de correlação de Spearman demonstrou uma correlação positiva fraca entre ROR γ t e IL-17, havendo significância estatística. Em relação a isto, Hu et al. (2011) em estudo com pacientes portadores de glioma, não encontraram níveis protéicos correspondentes de IL-17 e ROR γ t, o que os levou a sugerir que a expressão da IL-17 poderia não ser mediada por um fator de transcrição único. Nguyen et al. (2008) verificaram marcada diferença entre o número de células marcadas positivas ou negativas para IL-17 ou IL-23 nos mesmos cortes de glândula salivar provenientes de pacientes com Síndrome de Sjögren. De acordo com Rauen et al. (2012) há algumas isoformas do ROR γ t (ROR γ t- Δ) que reprime potencialmente a transcrição

do gene para a IL-17. Estudos na literatura têm demonstrado que pode haver supressão de IL-17 sem haver alteração nos níveis de ROR γ t. Na presença de TGF- β há aumento dos níveis de Foxp3 que interagem diretamente com o ROR γ t, inibindo sua atividade transcricional e consequentemente a expressão de IL-17, porém sem afetar os níveis de ROR γ t (CHEN; SHANNON, 2013). Acredita-se, ainda, que menos da metade das células ROR γ t⁺ expressem a IL-17 (LOCHNER et al., 2008). Desta forma, a IL-17 presente nas lesões de lábio pode, de certa forma, não estar correlacionada à presença do ROR γ t, e a fraca correlação negativa encontrada, tenha sido um achado ocasional.

Nesta pesquisa encontramos algumas dificuldades, não sendo possível realizar conclusões mais abrangentes devido ao pequeno tamanho da amostra e à ausência de dados clínicos nas lesões de lábio, o que não nos permitiu delinear o verdadeiro comportamento clínico dessa amostra, nos limitando a fazer correlações apenas com o que é amplamente difundido na literatura sobre o bom prognóstico do CCE de lábio. Além disto, frisamos que se faz necessário uma abordagem mais ampla de todos os fenótipos relacionados às células Th17 para entendermos qual o perfil celular expresso naquele momento no tumor, visto que a mesma célula pode expressar variações fenotípicas que agem de formas antagônicas. E por fim, a falta de pesquisas sobre células Th17 em CCEO limitou este estudo por nos basearmos apenas em parâmetros comparativos com outras lesões de câncer, porém com etiopatogenia, muitas vezes, distinta do CCE e também levando-se em consideração que a grande maioria dos estudos com Th17 aborda doenças autoimunes ou inflamatórias.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Foi encontrada maior quantidade estatisticamente significativa de linfócitos imunomarcados para a IL-17 nos casos de CCE de lábio quando comparado aos CCE de língua. Esse achado sugere um possível papel antitumoral da IL-17 para estes casos de CCE de lábio.
- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na imunexpressão do ROR γ t entre os casos de CCE de lábio e língua. Inferimos que estes resultados possivelmente se devem a ampla dualidade do papel pró-tumoral e antitumoral das células Th17 e à sua plasticidade que, na presença de diferentes citocinas expressas no microambiente tumoral, podem, de forma recíproca, alterar o seu fenótipo com células Treg, gerando fenótipos distintos, como por exemplo: ROR γ t⁺ Foxp3⁺, Foxp3⁺IL-17⁺, ROR γ t⁺ Foxp3⁺IL-17⁺.
- Por fim, os presentes achados desta amostra sugerem realmente uma possível participação da linhagem T CD4⁺ Th17 na patogênese do CCE de lábio e língua que devem ser melhor esclarecidos em futuras pesquisas que possam abranger todos os processos necessários ao desenvolvimento da linhagem Th17, visto sua relatada amplitude de funções no ambiente tumoral, bem como sua reconhecida plasticidade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. **Imunologia celular e molecular**. 7^a ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 545p, 2012.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V. et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nat Immunol**, v. 8, n.6, p. 639-46, 2007.
- ALBUQUERQUE et al. A pioneering epidemiological study investigating the incidence of squamous cell carcinoma of tongue in a Portuguese population. **Med Oral Pathol Oral Cir Bucal**, v.17, n.4, p.e550-4, 2012.
- ALIZADEH, D.; KATSANIS, E.; LARMONIER, N. The multifaceted role of Th17 lymphocytes and their associated cytokines in cancer. **Clin Dev Immunol.**, v.2013, s/n, p.1-11, 2013.
- AMEDEI, A, et al. T cells in gastric cancer: friends or foes. **Clin Dev Immunol**, v.2012, p.1-10, 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta, Ga: **American Cancer Society**; 2014.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Malignance grading of squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. **Scand J Dent Res**, v.94, n.4, p.347-56, 1986b.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand Dent Res**, v.95, n.3, p.229-249,1987.
- ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S.; SILVERMAN, S. Jr. Malignance grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and the floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **J Oral Pathol**, v.15, n.3, p.162-8, 1986a.
- ANNUNZIATO F. et al. Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites os human disorders. **Semin Immunol**, v.55, n.4, p. 299-304, 2013.
- ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1849-61, 2007.
- ANTUNES, A. A.; ANTUNES, A.P. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. **Rev Bras Cancer**, v. 50, n. 4, p. 295-300, 2004.
- ANTUNES, A. A. et al. Câncer da língua: estudo retrospectivo de vinte anos. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v. 36, n. 3, p. 152-154, 2007.
- APPLEBAUM, K.M. et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v.99, n.3, p.1801-1810, 2007.
- BADOUAL, C. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. **Clin Cancer Res**, v.12, n.2, p.465-72, 2006.

BASU, R.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. The Th17 family: flexibility follows function. **Immunol Rev**, v.252, n.1, p.89-103, 2013.

BATISTA, A.C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.109, p.74-9, 2010.

BENCHETRIT, F. et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2114-2121, 2002.

BENCHETRIT, F. et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. **Blood**, v. 99, p.2114-21,2002.

BENEVIDES, L, et al. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. **Eur J Immunol.**, v.43, n.6, p.1518-28, 2013.

BETTELLI, E. et al. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n.6, p. 652-57, 2007.

BETTENDORF, O.; PIFFKÓ, J.; BÁNKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol**, v.40, n.2, p.110-19, 2004.

BLATNER, N.R. et al. Expression of ROR γ t marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer. **Sci Transl Med**, v.4, n.164, p. 164ra159, 2012.

BLATNER, N.R.; GOUNARI, F.; KHAZAIE, K. The two faces of regulatory T cells in cancer. **Oncoimmunology**, v.2, n.5, p.e23852, 2013.

BONI, A. et al. Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers. **Blood**, v.112, n.12, p. 4746–54, 2008.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras Cancer**, v. 1, n. 53, p. 63-69, 2007.

BRONTE, V. Th17 and cancer: friends or foes? **Blood**, v. 112, n. 2, p. 214, 2008.

BRUCKLACHER-WALDERT, V. et al. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. **Brain**, v. 132, s/n, p.3329-41, 2009.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.18, n.8, p.432-37, 1989.

BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v.4, n.2, p.70-77, 1998.

CAMPOLI, M.; CHANG, C.C.; FERRONE, S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection [review]. **Vaccine**, v.20, p.A40–A45, 2002.

CANTO; M.T.; DEVESA, S.S. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in United States, 1975-1998. **Oral Oncol**, v.38, n.6, p.610-7, 2002.

CHEN, D. et al. Chemokine/chemokine receptor interactions contribute to the accumulation of Th17 cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Hum Immunol.**, v.73, n.11, p.1068-72, 2012b.

CHEN, D. et al. Increased IL-17-producing CD4+ T cells in patients with esophageal cancer. **Cell Immunol.**, v.272, n.2, p.166-74, 2012a.

CHEN, G.; SHANNON, M.F. Transcription Factors and Th17 Cell Development in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Crit Rev Immunol**, v.33, n.2, p.165-82, 2013.

CHEN, J.G. et al. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. **Int J Biol Sci.**, v.7, n.1, p.53-60, 2011.

CHEN, X. et al. Increased IL-17- producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. **Lung Cancer**, v.69, n.3, p.348-54, 2010.

CHEN, Z. et al. The Th17/Treg balance and the expression of related. **Diagn Pathol.**, v.15, p.8-61, 2013.

CHOI, K. K. et al. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. **Oral Oncol.**, v. 42, n. 2, p. 208-217, 2006.

CHUGH S. et al. Involvement of Th17 cells in patients os urothelial carcinoma of bladder. **Hum Immunol**. v.74, n.10, p.1258-62, 2013.

COSTA A.L.L. et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesq Odontol Bras**, v.16, n.3, p.216-20, 2002.

COSTA, A. A. et al. Characterization of the evolution of immune phenotype during the development and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Immunol Immunother**, v. 61, n.6, p. 927-39, 2012.

COSTA, A.L.L. et al. Oral squamous cell carcinoma; retrospective study of 389 cases. **J Dental Research**, v.79, n.5, p.1094, 2000.

CUNHA, L. L. et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 77, n.6, p. 918-25, 2012.

D'ELIOS, M.M. et al. T-cell response to bacterial agents. **J Infected Dev Ctries**, v.5, n.9, p. 640-5, 2011.

DAMSKER, J.M.; HANSEN, A.M.; CASPI, R.R. Th1 and Th17 cells. **Ann N Y Acad Sci**, v.1183, p.211-21, 2010.

DERRE, L. et al. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. **J. Immunol**, v.177, n.5, p.3100-07, 2006.

- DONG, H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med**, v.8, n.8, p.793-800, 2002
- DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 991-98, 2002.
- FELLER, L. et al. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Face Med**, v.6, p.6-15, 2010.
- FENG, L.L.; WANG, X. Targeting Foxp3+ regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy. **Chin Med J (Engl)**, v.123, n.22, p.3334-42, 2010.
- FRITZ, P.A. et al. International classification of disease for oncology. 3ed. Geneva, Switzerland: **WHO**, 2000.
- FRONIE, A. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. **Rom J Morphol Embryol.**, v.54, n.2, p.343-8, 2013.
- GAETTI-JARDIM, E.C. et al. Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. **Rev Odont Araçatuba**, v. 31, n. 2, p. 09-13, 2010.
- GALON, J., et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v.313, n.5795, p. 1960-4, 2006.
- GAUR, P. et al. Skewed immunological balance between Th17 (CD4+IL17A+) and Treg (CD4+CD25+FOXP3+) cells in human oral squamous cell carcinoma. **Cell Oncol**, v.35, n.5, p. 335-343, 2012.
- GHORESCHI, K. et al. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. **Trends Immunol**, v.32, n.9, p.395-401, 2011.
- GNERLICH, J.L. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. **J Immunol.**, v.185, n.7, p.4063-71, 2010.
- GORELIK, L.; FLAVELL, R.A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. **Nat Med**, v.7, n.10, p.1118-22, 2001.
- GRETEN, F.T. et al. Human Th17 cells in patients with cancer: Friends or foe? **Oncoimmunology**, v.1, n.8, p.1438-9, 2012.
- GRIMM, M. Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC. **Clin Transl Oncol**, v.14, p.870-80, 2012.
- GUTIERREZ-PASCUAL, M. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.26, p.1116–21, 2012.
- HARRINGTON, L. et al. The paradoxical role of Th1 effector CD4 T cells during autoimmune chronic inflammation. **J. Immunol**, v.184, p.143-7, 2010.

- HARRINGTON, L.E. et al. Interleukin 17-producing CD⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v.6, n.11, p.1123-32, 2005.
- HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; WEAVER, C.T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr Opin Immunol**, v.18, n.3, p. 349-56, 2006.
- HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **JNCI**, v. 99, n. 10, p. 777-789, 2007.
- HE, D. et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. **J Immunol**, v.184, n.5, p.2281-8, 2010.
- HE, S. et al. Distribution and clinical significance of th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. **Int J Mol Sci**, v.12, n.11, p.7424-37, 2011.
- HEMDAN, N. Y. A. Anti-cancer versus cancer-promoting effects of the interleukin-17-producing T helper cells. **Immunol Lett**, v. 149, n. 1-2, p. 01-11, 2012.
- HINZ, S. et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. **Oncogene**, v.19, n.48, p.5477-86, 2000.
- HIRAHARA, N. et al. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. **Oncology**, v.61, p.79-89, 2011.
- HIRAHARA, N. et al., Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. **Anticancer Res.**, v.20 p.3137-42, 2000.
- HORA, J.A.A. Perfil epidemiológico dos casos de carcinoma epidermóide da cavidade oral no Estado de Sergipe, no período de 1979 a 1999. Natal, 2001. 72p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva). Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- HU, J. et al. The profile of th17 subset in glioma. **Int Immunopharmacol**. v.11, n. 9, p.1173-9, 2011.
- HUANG, Z.; FU, Z.X. Localization of IL-17⁺Foxp3⁺ T cells in esophageal cancer. **Immunol Invest**, v.40, n.4, p.400-12, 2011.
- HUNTER, K.D.; PARKINSON, E.K.; HARRINSON, P.R. Profiling early head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v.5, n.2, p.127-35, 2005.
- HUNTER, K.; PARKINSON, E.; THAKKER, N. An overview of the molecular pathology of head and neck cancer, and its clinical implications. **Periodontol 2000**, v.57, n.1, p.132-49, 2011.
- HUS, I. et al. Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. **Plos One**, v.8, n.11, p.e78091, 2013.

IAMAROOM, A. et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on Young people. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.23, s/n, p.84-8, 2004.

INCA: Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Inca**, 2014. 118p.

IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JETTEN, A.M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nucl Recept Signal.**, v.7, p.e003, 2009.

JOHNSON, N.W. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetology. **Periodontol**, v.57, n.1, p.19-37, 2011.

JOHNSON, N.W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A.A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontol 2000**, v.57, n.1, p. 19-37, 2011.

KADEMANI, D. et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: The Influence of histologic grade. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, n.11, p.1599-1605, 2005.

KAGAMI, S. et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 5, p. 1373-1383, 2010.

KANSY, K.; THIELE, E.; FREIER, K. The role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma: myth and reality. **Oral Maxillofac Surg**, 2012.

KATOAKA, T. et al. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. **J Immunol**, v.161, n.8, p.3936-42, 1998.

KENNEDY, C.L. et al The molecular pathogenesis of STAT3- driven gastric tumorigenesis in mice is independent of IL-17. **J Pathol.**, v.225, n. 2, p.255-64, 2011.

KESSELRING, R. et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. **Br J Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1245-54, 2010.

KESSELRING, R. et al. The number of CD161 positive Th17 cells are decreased in head and neck cancer patients. **Cell Immunol**, v.269, n.2, p.74-7, 2011.

KIM, J.S.; JORDAN, M.S. Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. **Cell Mol Life Sci**, v.70, n.13, p.2271-90, 2013.

KLIMP, A. H. et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 44, n.2, p. 143-61, 2002.

KOLLS, J.K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, n.4, p.467-76, 2004.

- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KORN, T. et al. L-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p.484-488, 2007.
- KRICZEK, I. et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. **J Immunol**, v. 178, n.11, p.6730-3, 2007.
- KRICZEK, I. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood**, v. 114, n.6, p. 1141-9, 2009a.
- KRYCZEK, I. et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. **Blood**, v. 114, n.2, p. 357-9, 2009b
- KUROKAWA, H. et al. Predictive markers for late cervical lymph node metastasis in patients with N0 squamous cell carcinoma of the tongue. **Asian J Oral Maxillofac Surg**, n.18, p.120-6, 2006.
- LAKSHMI NARENDRA, B. et al. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflamm Res**, v.62, n.9, p.823-34, 2013.
- LANGOWSKI, J. L.; KASTELEIN, R.A. OFT, M. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immunosurveillance. **Trends Immunol**, v.28, n.5, p.207-12, 2007.
- LANGOWSKI, L.J. et al. IL-23 promotes tumor incidence and growth. **Nature**, v.442, n.7101, p.461-5, 2006.
- LANGRISH, C.L. et al. L-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med**, v.201, n.2, p. 233-40, 2005.
- LE GOUVELLO, S. et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. **Gut**, v.57, p.772-9, 2008.
- LEE, J. et al. Increased prevalence of interleukin-17-producing cd41 tumor infiltrating lymphocytes in human oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.33, n.9, p. 1301-8, 2011.
- LI, C. et al. Increase prevalence of Th17 cells in the peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112, n.1, p.81-9, 2011.
- LI, L.; BOUSSIOTIS, V.A. The role of IL-17-producing Foxp3+ CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. **Clin Immunol.**, v.148, n.2, p.246-53, 2013.
- LIM, H. W. et al. Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+. Regulatory T cells. **J Immunol**, v. 180, n.1, p. 122-9, 2008.
- LIM, M. S. RE: correlational of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, by Kim S-H, Cho NH, Kim K, et al. **J. Surg. Oncol.**, v. 93, n. 4, p. 253-254, 2006.
- LIM, S.C. et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Clin Cancer Res**, v.10, n.1, p.166-172, 2004.

- LIN, H. H. et al. Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: Applications for vaccine research. **BMC Immunol**, v. 9, n. 8, p. 01-13, 2008.
- LINDENBLATT, R.C. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems — analysis of the best survival predictor. **J Oral Pathol Med**, v.34, p.34–9, 2012.
- LIU, J. et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.407, n.2, p.348-54, 2011.
- LU, L. et al. IL-17A promotes immune cell recruitment in human esophageal cancers and the infiltrating dendritic cells represent a positive prognostic marker for patient survival. **J Immunother.**, v.36, n.8, p.451-8, 2013.
- LOCHNER, M. et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. **J Exp Med**, v.205, n.6, p.1381-93, 2008.
- LUCKHEERAM, R.V. et al. CD4+ T cells: differentiation and functions. **Clin Dev Immunol**, p. 1-12, 2012.
- MA, C.; DONG, X. Colorectal cancer-derived Foxp3(+) IL-17(+) T cells suppress tumour-specific CD8+ T cells. **Scand J Immunol**, v.74, n.1, p.47-51, 2011.
- MADDUR, M.S. et al. th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. **Am J Pathol**, v.181, n.1, p.8-18, 2012.
- MANNARINI, L. et al.. Human papilloma vírus (HPV) in head and neck region: review of literature. **Acta Otorhinol Ital**, v.29, n.3, p.119-126, 2009.
- MARTIN-OROZCO, N. et al. T Helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity**, v.31, n.5, p. 787–98, 2009.
- MCGEACHY, M.J.; CUA, D.J. Th17 cell and differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v.28, n.4, p. 445-53, 2008.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.Jr. Innate Immunity. **N Engl J Med**, v.343, n.5, p.338-344, 2000.
- MÉNORET, E. et al. IL-21 stimulates human myeloma cell growth through naautocrine IGF-1 loop. **J Immunol**, v. 181, n.10, p. 6837-42, 2008.
- MIDDLETON, G.W.; ANNELS, N.E.; PANDHA, H.S. Are we ready to start of Th17 manipulation as a therapy for câncer? **Cancer Immunol Immunother.**, v.61, n.1, p.1-7, 2012.
- MIRANDA, J.L. Expressão de proteínas de matriz extracelular em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua. Natal, 2002, 119p. Tese (Doutorado em Patologia Oral). Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- MIYAHARA, Y. et al. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, n.40, p.15505-10, 2008.

- MONSJOU, H.S. et al. Et al. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oral Oncol**, v.49, n.12, p.1097-102, 2013.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v.7, p.145-73, 1989.
- MURANSKI, P. et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. **Immunity**, v.35, n.6, p.972-85, 2011.
- MURANSKI, P. et al. Tumor-specific Th17- polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v. 112, n.2, p. 362-73, 2008.
- NAM, J. et al. Transforming Growth Factor b Subverts the Immune System into Directly Promoting Tumor Growth through Interleukin-17. **Cancer Res**, v. 68, n. 10, p. 3915-23, 2008.
- NEVILLE B.W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 972p, 2009.
- NGUYEN, C.Q. et al. Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in sjögren´s syndrome. **Arthritis Rheum**, v.58, n.3, p.734-43, 2008
- NUMASAKI, M. et al. IL-17 Enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. **J Immunol**, v. 175, n.9, p. 6177-89, 2005.
- NUMASAKI, M. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. **Blood**, v. 101, n.7, p. 2620-7, 2003.
- NUÑEZ, S. et al. Th17 cells contribute to anti-tumor immunity and promote the recruitment of th1 cells to the tumor. **Immunology**, v. 139, n.1, p.61-71, 2013.
- OGBUREKE, K.U.E. et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. **Oral Oncol**, v.43, n.9, p.920-32, 2007.
- OH, S.H. et al. Expression of interleukin-17 is correlated with interferon-a expression in cutaneous lesions of lúpus erythematosus. **Clin Exp Dermatol**, v.36, n.5, p.512-29, 2011.
- OKADA, Y. et al. An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.32, p.284-288, 2003.
- OLIVEIRA, M. C. et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 69, n. 4, p. 553-59, 2003.
- OLIVER, A.J.; HELFRICK, J.F.; GARD, D. Primary oral squamous cell carcinoma. A review of 92 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v.54, s/n, p.949-56, 1996.
- OSTERNE, R.L.V. et al. Lip lesions in a brazilian population. **J Craniofac Surg**, v.22, n.6, p.2421-5, 2011.
- OSTRAND-ROSENBERG, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. **Curr Opin Genet Dev**, v. 18, p. 11-18, 2008.

- PALADUGU, M. et al. Generation and immunologic functions of Th17 cells in malignant gliomas. **Cancer Immunol Immunother.**, v.62, n.1, p.75-86, 2013.
- PANZARELLA, V. et al. Diagnostic delay in oral squamous cell carcinoma: the role of cognitive and psychological variables. **Int J Oral Sci.**, v.29, *Impress*, 2013.
- PATEL, S.F. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J Clin Oncol.**, v.10, n.11, p.1488-94, 2011.
- PEIXOTO, R.F. et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3(+) cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch Oral Biol**, 2012. No prelo.
- PERNIS, A.B. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **J Intern Med**, v.265, n.6, p.644-652, 2009.
- PETERS, A.; LEE, Y; KUCHROO, V.K. The many faces of Th17 cells. **Curr Opin Immunol**, v.23, n.6, p.702-6, 2011.
- PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n.4-5, p. 340-50, 2009.
- PIRES, F.R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. **J Appl Oral Sci**, v.21, n.5, p. 460-7, 2013.
- PIRES, F.R. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period . **J Appl Oral Sci**, v.21, n.5, p.460-7, 2013.
- PIVA, M.R. et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- α , TGF- β and NF- κ B expression. **Oncol Lett.**, v.5, n.6, p.1909-14, 2013.
- POESCHL, P.W. et al. Staging and grading as prognostic factors in maxillary squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, v.69, n.12, p.3038-44, 2011.
- PRATESI, N. et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. **Radiother Oncol**, v.99, n.3, p.356-61, 2011.
- PRIME, S. S. et al. TGF-beta signal transduction in oro-facial health and non-malignant disease (part I). **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p.324-336, 2004.
- QI, W.; HUANG, X. WANG, J. correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. **Cell. Immunol**, v.285, n.1-2, p.18-22, 2013.
- QUAN, J. et al. Transforming growth factor-b1 treatment of oral cancer induces epithelial-mesenchymal transition and promotes bone invasion via enhanced activity of osteoclasts. **Clin Exp Metastasis**, v.30, n.5, p.659-70, 2013.
- RAUEN, T. et al. A novel isoform of the orphan receptor ROR γ t suppresses IL-17 production in human T cells. **Genes Immun**, v.13, n.4, p.346-50, 2012.

RIEDEL, F.; GOESSLER, U.R.; HORMAAN, K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. **Did Dis**, v.23, n.3-4, p.195-203, 2005.

ROMAGNANI, S. et al. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol Today**, v. 18, n. 6, p. 263-66, 1997.

ROSENQUIST, K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in Southern Sweden. **Swed Dent J Suppl**, v.179, p.1-66, 2005.

RUBIE, C. et al. Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 alpha in hepatocellular carcinoma. **Scand J Immunol**, v.63, n.6, p.468-77, 2006.

SANTOS, L. C.; BATISTA ODE M.; CANGUSSU, M.C. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 76, n. 4, p. 416-22, 2010.

SARGERAN, K. et al. Survival after lip cancer diagnosis. **J Craniofac Surg**, v.20, p.248-52, 2009.

SASAKI, T. et al. Clinical-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients G40 years of age. **J Oral Pathol Med**, v.34, s/n, p.129-33, 2005.

SATO, E. et al. Intraepithelial CD8₊ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8₊/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.112, n.51, p.18538-43, 2005.

SATO, W.T.; ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Cutting edge: human Th17 cells are identified as bearing CCR2⁺CCR5⁻ phenotype. **J. Immunol**, V.178, n.12, p.7525-28, 2007.

SAWAIR, F.A. et al. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.1, p.1-9, 2003.

SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p 53. **Cell**, v. 63, n.6, p. 1129-36, 1990.

SCHWARTZ, R.H. T cell anergy. **Annu Rev Immunol**, v.21, p.305-34, 2003.

SCOTT, S. E.; MCGURK, M.; GRUNFELD, E. Patient delay for potentially malignant oral symptoms. **Eur J Oral Sci**, v. 116, n.2, p. 141-47, 2008.

SCOTT, S. E.; MCGURK, M.; GRUNFELD, E.A. The process of symptom appraisal: cognitive and emotional responses to detecting potentially malignant oral symptoms. **J Psychosom Res**, v.62, n.6, p.621-30, 2007.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n.8, p. 599-612, 2007.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

SENA, M.F.; COSTA, A.P.S.; FERREIRA, M.A.F. Características sociodemográficas, clínicas e histopatológica de pacientes com carcinoma epidermóide de lábio: uma análise retrospectiva (1997-2004). **Med (Ribeirão)**, v.46, n.2, p.128-34, 2013.

SENOVILLA, L et al. . Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. **Oncoimmunology**, v.1, n.8, p.1323-43, 2012.

SFANOS, K. S. et al. Phenotypic Analysis of Prostate-Infiltrating Lymphocytes Reveals Th17 and Treg Skewing. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 11, p. 3254-61, 2008.

SGARBI, F.C.; CARMO, E.D.; ROSA, L.E.B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. *Rev. Ciênc. Méd.*, v.16, n.4-6, p.245-50, 2007.

SHEN, C.J. et al. Increased numbers of T helper 17 cells and the correlation with clinicopathological characteristics in multiple myeloma. **J Int Med Res**, v.40, n.2, p. 556-64, 2012.

SHI, Y. The Role of Interleukin-17A in Colorectal Tumorigenesis. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 26, n.6, p.429-32, 2013.

SHPITZER, T. et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. **Br J Cancer**, v.101, p.1194-8, 2009.

SIEBERS, T.J.H. et al. No high-risk HPV detected in SCC of the oral tongue in the absolute absence of tobacco and alcohol - a case study of seven patients. **Oral Maxillofac Surg**, v.12, n.4, p.185-88, 2008.

SILVA, C. C.; AMARAL, B.; BULHOSA, J.F. Carcinoma espinocelular da língua – factores de risco e importância do reconhecimento de lesões pré-malignas. **Rev Port de Estomatol Med Dent e Cir Maxilofac**, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2010.

SILVEIRA, E.J.D. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int JSurg Pathol**, v.15, p.376-83, 2007. .

SILVEIRA, E.J.D. Carcinoma epidermóide de língua: correlação clínica histológica e imuno-histoquímica. Natal, 2004. 114p. Dissertação (Mestrado em Patologia Oral). Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SOBIN, L. et al. TNM classification of malignant tumors. International Union Against Cancer (UICC), 2009; Disponível em: <http://www.uicc.org/resources/tnm>

SOUZA, L. R. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. **Med Oral Patol Cir Bucal**, v. 16, n. 6, p. 757-762, 2011.

SPIRO, R.H. et al. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. **Head and Neck**, v.21, n.5, p.408-13, 1999.

- STEINER, G.E. et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate, **Prostate**, v.56, n.3, p.171-82, 2003.
- SU, X. et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 Cells. **J Immunol**, v. 184, n.3, p. 1630-1641, 2010.
- SU, Z. et al. Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis. **Immunol Res**, v.58, p.118-24, 2014.
- SUBAPRIYA, R. Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a case-control study. **Eur J Cancer Prev**, v.16, n.3, p.251-56, 2007.
- SUMMERSGILL, K. F. et al. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 90, n. 3, p. 334-9, 2000.
- SUNDRUD, M.S.; TRIVIGNO, C. Identity crisis of Th17 cells: Many forms, many functions, many questions. **Semin Immunol.**, v.25, n.4, p.263-72, 2013.
- SWANN, J.; SMYTH, M.J. Immune Surveillance of tumors. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, 2007.
- TAO, X. et al. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. **J Immunol**, v.159, n.12, p. 5956-5963, 1997.
- TARTOUR, E. et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of
- TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunol Rev**, v. 223, p. 87-113, 2008.
- TONG, Z. et al. A Protective Role by Interleukin-17F in colon tumorigenesis. **Plos One**, v.7, n.4, p.E3459, 2012.
- TOSOLINI, M. et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. **Cancer Res**, v. 71, n. 4, p. 1263-71, 2011.
- TRAN, H.E.; PRINCE, N.E.; OWENS, T. IFN- γ shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. **J Immunol**, v.164, n.5, p.2759-68, 2000.
- TRIPATHI, P.; AGRAWAL, S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. **Cancer Invest**, v.24, n.2, p.178-186, 2006.
- VAN DE VEERDONK, F.L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. **BMP Rep**, v.42, n.12, p.776-87, 2009.
- VAN LEEUWEN, M. T. et al. Immunosuppression and Other Risk Factors for Lip Cancer after Kidney Transplantation. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n.2, p. 561-69, 2009.
- VARGAS-FERREIRA, F. et al. Etiologic Factors Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma in Non-Smokers and Non-Alcoholic Drinkers: A Brief Approach. **Braz Dent J**, v. 23, n. 5, p. 586-90, 2012.

- VARTANIAN, J.G. et al. Predictive factors and distribution of lymph node metastasis in lip cancer patients and their implications on the treatment of the neck. **Oral Oncol.**, v.40, p.223-7, 2004.
- VIEIRA, R. A. M. A. R. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2011.
- VOO, K.S. et al. Identification of IL-17-producing Foxp3+ regulatory T cells in humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, n.12, p.4793-8, 2009.
- WANG, J. et al. The changes of Th17 cells and the related cytokines in the progression of human colorectal cancers. **BMC Cancer**, v.12, n.418, p.1-10, 2012.
- WANG, R. et al. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. **Trends in Immunol**, v. 22, n. 5, p. 269-76, 2001.
- WANG, W.W. et al. Increased level of Th17 cells in peripheral blood correlates with the development of hepatocellular carcinoma, **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v.32, n.10, p.757-61, 2010.
- WANG, X. et al. Growth inhibition induced by transforming growth factor- β 1 in human oral squamous cell carcinoma. **Mol Biol Re**, v.36, n.5, p.861-9, 2009.
- WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n.4-5, p. 309-16, 2009.
- WEAVER, C.T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu Rev Immunol**, v.25, p.821-52, 2007.
- WOLFF, K.; FOLLMAN, M.; NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. **Dtsch Arztebl Int**, v. 109, n. 48, p. 829-35, 2012.
- WOOLGAR, J.A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.42, n.3, p.229-239, 2006.
- WU, C. et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clin Exp Immunol**, v. 158, n. 2, p. 199-204, 2009.
- WU, J. et al. Elevated pretherapy serum IL17 in primary hepatocellular carcinoma patients correlate to increased risk of early recurrence after curative hepatectomy. **Plos One**, v.7, n.12, p.e50035, 2012.
- YAMADA, Y.; SAITO, H.;IKEGUCHI, M. Prevalence and clinical relevance of Th17 cells in patients with gastric cancer. **Journal of Surgical Research**, v.178, p.685-691, 2012.
- YANG, J. et al. Th17 and natural Treg cell population. Dynamics in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.60, n.5, p.1472-83, 2009.
- YANG, L.J. et al. Expression of Th17 cells in breast cancer tissue and its association with clinical parameters. **Cell Biochem Biophys**, v.62, p.153-9, 2012.
- YE, J.; LIVERGOOD, R.S.; PENG, G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. **Am J Pathol.**, v.182, n.1, p.10-20, 2013.

- YE, Z.J. et al. Generation and differentiation of IL-17-producing CD4⁺ T cells in malignant pleural effusion. **J Immunol.**, v.185, n.10, p.6348-54, 2010.
- YEN, H. R. et al. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. **J. Immunol.**, v.183, n.11, p.7161-8, 2009.
- YU, P. Intratumor depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. **J Exp Med**, v.201, n.5, p.779-91, 2005.
- ZAMAI, L. et al. Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. **J Exp Med**, v. 188, n. 12, p. 2375-80, 1998.
- ZHANG B. et al. The prevalence of th17 cells in patients with gastric cancer. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.374, n.3, p.533-7, 2008.
- ZHANG, G. et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. **J. Immunol**, v.170, n.4, p. 2153-60, 2003.
- ZHANG, J.P. et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients, **J. Hepatol**, v.50, n.5, p.980-9, 2009.
- ZHANG, W. et al. Changes of Th17/Tc17 and Th17/Treg cells in endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol.**, v.13, *Impress*, 2014.
- ZHANG, X.G. et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-β2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. **J Immunol**, v.170, n.4, p.2163-60, 2013.
- ZHANG, Y.L. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. **Mol Cancer**, v.9, n.4, p.1-4, 2010.
- ZHANG, Z.; KYTTARIS, V.C.; TSOKOS, G.C. the role of IL-23/IL-17 axis lupus nephritis. **J Immunol**, v.183, n.5, p.3160-9, 2009.
- ZHAO, L. et al. Imbalance in the Th17/Treg and cytokine environment in peripheral blood of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **Med Oncol.**, v.30, n.1, p.461, 2013.
- ZHU X. et al. IL-17 expression by breast cancer associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res.**, v.10, n.6, p. R95, 2008.
- ZHU, X. et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes
- ZNAOR, A. et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in indian men. **Int J Cancer**, v. 105, n.5, p. 681-686, 2003.
- ZOU, W.; RESTIFO, N. Th17 in tumor immunity and immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, v.10, n.4, p.248-56, 2010.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido para a obtenção dos espécimes de carcinoma oral de células escamosas de lábio e/ou língua



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa **“IMUNOEXPRESSÃO DA IL-17 E ROR γ t EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO E LÍNGUA”**, que é coordenada pela Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Essa pesquisa procura avaliar proteínas (substâncias) presentes em fragmentos de carcinoma oral de células escamosas de lábio e/ou língua (tecido doente que foi retirado da sua boca). Caso você decida aceitar o convite, não irá passar por nenhum procedimento clínico ou cirúrgico, não havendo qualquer desconforto. Apenas nos dará a oportunidade de manusear o material já recolhido durante biópsia realizada previamente em sua pessoa, para que possamos estudar as características desta lesão. Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

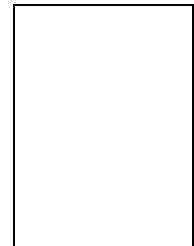
Você não será manipulado cirúrgica nem clinicamente, sendo assim, o risco de sua participação nesse estudo é mínimo.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel, no Departamento de Odontologia da UFRN, no endereço Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787, Lagoa Nova, Natal – RN, ou pelo telefone (84)3215-4138. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, localizado no *Campus* Universitário da UFRN, ou pelo telefone (84)3215-3135.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa **“ANÁLISE DA RESPOSTA Th17 EM CARCINOMAS ORAIS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO E LÍNGUA”**.



Assinatura do Participante

Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel

Pesquisadora Responsável

Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787. Lagoa Nova, Natal/RN. CEP – 59056-000

Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (Tel: 84-32153135)

APÊNDICE B - Dados clínicos obtidos a partir dos prontuários clínicos dos pacientes portadores de carcinoma oral de células escamosas de lábio.

Ficha clínica	
Localização do tumor	
Sexo	
Idade	
Gradação histológica	

APÊNDICE C – Dados clínicos obtidos a partir dos prontuários clínicos dos pacientes portadores de carcinoma oral de células escamosas de língua.

Ficha clínica			
Localização do tumor			
Sexo			
Idade			
Estadiamento I			
Estadiamento II			
Estadiamento III			
Estadiamento IV			
Gradação histológica			

APÊNDICE D - Gradação histológica de malignidade dos carcinomas orais de células escamosas de lábio e língua segundo o sistema proposto e revisado por Bryne (1998).

Caso n ^o	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório	Escore total	Gradação histológica
1						
2						
...						

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa UFRN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA RESPOSTA Th17 EM CARCINOMAS ORAIS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO E LÍNGUA

Pesquisador: MÁRCIA CRISTINA DA COSTA MIGUEL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14681613.2.0000.5537

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Patologia Oral

Patrocinador Principal: Pós-Graduação em Patologia Oral

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 266.928

Data da Relatoria: 26/04/2013

Apresentação do Projeto:

A pesquisa Análise da Resposta Th17 em Carcinomas Oraís de Células Escamosas de Lábio e Língua será executada no escopo de um curso de mestrado. Os Carcinomas Oraís de Células Escamosas (COCE) são tipos muito frequentes de câncer. Os mecanismos de regulação da resposta imune à presença deste tipo de células tem sido objeto de estudo e mostrou-se que a resposta Th17 está de algum modo envolvida. Entretanto, se a resposta Th17 é pró-cancerígena ou protetora é objeto de controvérsia. A resposta Th17 é mediada pelas citocinas IL-17, IL-23 e ROR γ T e a presença dessas citocinas, além de sexo e idade, serão investigada. Para as análises serão utilizadas amostras de biópsias realizadas em pacientes com COCE (40 COCE de lábio e 40 COCE de língua) com o intuito de verificar a expressão (através de técnicas de imunohistoquímica) das citocinas previamente mencionadas. Os participantes serão inicialmente contactados via telefone e, uma vez consentindo, receberão a visita das pesquisadoras e serão apresentados ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a possível presença de células Th17 em amostras de COCE de lábio e língua através da

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.075-070

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

Fax: (84)3215-3135

E-mail: cepufm@relatoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 206.920

expressão imunistoquímica da IL-17, IL-23 e ROR γ T nestas lesões. Além disso, pretende-se correlacionar a presença das células Th17 com o grau histológico de malignidade, bem como com dados clínicos relativos a sexo e idade nas amostras de lábio e com os dados clínicos relativos a sexo, idade e presença de metástase nas amostras de língua, com o intuito de melhorar a compreensão do papel dessa população celular na patogênese do COCE de lábio e língua”.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, já que a metodologia envolve o uso de amostras previamente biopsiadas e armazenadas nos arquivos do Serviço de Patologia Oral da UFRN. Os dados serão protegidos confidencialmente e a identidade dos participantes preservada. O benefício da pesquisa é indireto, consistindo numa melhor compreensão dos mecanismos de resposta imunológica frente à presença de câncer oral de células escamosas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante pois se trata da compreensão de mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de câncer oral. A metodologia é relativamente simples e o trabalho perfeitamente exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos: carta de apresentação, declaração de não início, termo de confidencialidade, termo de concessão, folha de rosto, formulário do CEP, projeto de pesquisa da Plataforma Brasil, Projeto completo, TCLE e Instrumento de pesquisa. Todos os termos estão de acordo com o exigido ética e legalmente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após revisão ética do protocolo em questão, concluímos que o mesmo se encontra bem instruído e obedecendo às normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo o ser humano.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova CEP: 59.078-970
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3215-3135 Fax: (84)3215-3135 E-mail: cepufn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 206.926

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deve: entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinada, sendo obrigatória a rubrica do pesquisador e do participante em todas as páginas e a assinatura de ambos na última página; desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após o CEP analisar as razões da descontinuidade; apresentar ao CEP eventuais emendas/extensões ao protocolo original, com justificativa; apresentar ao CEP relatório final.

NATAL, 09 de Maio de 2013

Assinador por:
Dulce Almeida
(Coordenador)

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova CEP: 59.078-970
UF: RN Município: NATAL
Telefone: (84)3215-3135 Fax: (84)3215-3135 E-mail: cepufm@reitoria.ufrn.br